

Departement für Pferde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. med. vet. Anton Fürst, Dipl. ECVS

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)
Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

**Etablierung eines *in vitro* Organmodells zur Untersuchung der
Knorpelremodellierung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Sophie Schöberl

Tierärztin
aus Stuttgart, Deutschland

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin

Prof. Dr. sc. nat. Cornel Fraefel, Korreferent

2016

Departement für Pferde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. med. vet. Anton Fürst, Dipl. ECVS

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)
Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

**Etablierung eines *in vitro* Organmodells zur Untersuchung der
Knorpelremodellierung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Sophie Schöberl

Tierärztin
aus Stuttgart, Deutschland

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin

Prof. Dr. sc. nat. Cornel Fraefel, Korreferent

2016

*Diese Arbeit widme ich
Eva, Michael und Uli Schöberl
in Liebe und Dankbarkeit!*

Zusammenfassung	1
Summary	2
1 Einleitung	3
1.1 Zielsetzung der Arbeit	4
1.2 Versuchsanordnung	4
2 Literaturübersicht	5
2.1 Gelenkknorpelaufbau	5
2.1.1 Unmineralisierter Knorpel.....	6
2.1.2 Mineralisierter Knorpel	6
2.1.3 Subchondrale Knochen.....	7
2.2 Knorpelremodellierung	7
2.3 Chondrozytenmigration	8
2.4 Zellmarkierungen	9
2.5 Virale Vektoren als Zellmarker	10
2.5.1 Adeno-assoziiertes Virus und seine Vektoren.....	11
2.5.2 Lentivirus und dessen Vektoren	14
2.6 Fixierung und Einbettungstechniken	16
3 Material und Methoden	17
3.1 Aufbau der Studie.....	17
3.2 Tiere.....	17
3.3 Verwendete Chemikalien, Geräte/Instrumente, Verbrauchsmaterial	17
3.3.1 Chemikalien.....	17
3.3.2 Geräte und Instrumente	19
3.3.3 Verbrauchsmaterialien.....	19
3.4 Medien.....	20
3.5 Entnahme.....	22
3.5.1 Explantatentnahme 1: Mit Luftdruck betriebener Bohrer	22
3.5.2 Explantatentnahme 2: Osteotom	23
3.5.3 Explantatentnahme 3: Handbohrer	23
3.5.4 Explantatentnahme 4: Osteochondrales Auto/Allograft System (OATS)...	23
3.6 Waschen	24

3.7	Präparieren	24
3.7.1	Präparieren der Explantate: Vorversuch 1	24
3.7.2	Präparieren der Explantate: Vorversuch 2	24
3.7.3	Präparieren der Explantate: Vorversuch 3	24
3.7.4	Präparieren der Explantate: Vorversuch 4	25
3.7.5	Präparieren der Explantate (Knorpelpellets) aus Vorversuch 4	25
3.8	Explantatkultur	26
3.9	Transduktion Zellen	27
3.9.1	Vorbereitung Zellen	27
3.9.2	Transduktion	29
3.10	Transduktion Explantate	31
3.10.1	Vorversuch Transduktion Lentivirus 1	31
3.10.2	Vorversuch Transduktion Lentivirus 2	32
3.10.3	Vorversuch Transduktion Lentivirus 3	32
3.10.4	Vorversuch Transduktion Lentivirus 4	33
3.11	Hauptversuch Transduktion	33
3.11.1	Transduktion	33
3.12	Fixierung und Einbettung der Proben	34
3.13	Herstellung von MMA Schnitten	34
3.14	Einbetten mit Technovit 9100	35
3.15	Entplasten	37
3.16	Toluidinblau Färbung	38
3.17	Hämatoxylin-Eosin Färbung	38
3.18	Einbetten der Schnitte	38
3.19	Evaluation	39
3.19.1	Vitalitätsuntersuchung der Explantate von verschiedenen Verfahren der Probeentnahme	39
3.19.2	Vitalität Längsschnitte	40
3.19.3	Toxizität Knochenkleber	40
3.19.4	Transduktion	40
4	Resultate	41
4.1	Resultate Entnahme	41
4.1.1	Explantatentnahme 1: Mit Luftdruck betriebener Bohrer	41

4.1.2	Explantatentnahme 2: Osteotom	42
4.1.3	Explantatentnahme 3: Handbohrer	42
4.1.4	Explantatentnahme 4: OATS.....	42
4.1.5	Präparieren der Explantate: Vorversuch 1.....	43
4.1.6	Präparieren der Explantate: Vorversuch 2.....	43
4.1.7	Präparieren der Explantate: Vorversuch 3.....	43
4.2	Resultate Transduktion	44
4.2.1	Transduktion Zellen	44
4.2.2	Transduktion mit verschiedenen Explantaten	46
4.2.3	Transduktion Explantate mit Bohrlöchern mit Knochenkleber	46
4.2.4	Transduktion Explantate mit Bohrlöchern in Agarose	46
4.2.5	Transduktion Knorpel pellet.....	46
4.2.6	Virus transduktion Sagittalschnitte der Knorpel pellets	46
4.3	Toxizität Knochenkleber	51
4.4	Resultate Schnitte für die Tod/Lebend-Färbung	51
4.5	Resultate MMA	52
4.6	Resultate Technovit 9100 Schnitte	52
5	Diskussion	53
5.1	Methodik	53
5.2	Schlussfolgerung und Perspektiven.....	56
6	Literaturverzeichnis	58
7	Abkürzungen	62
	Danksagung	
	Curriculum Vitae	

Zusammenfassung

Es gelang die Etablierung eines *in vitro*-Organmodells, welche es ermöglicht vitale Zellen im Knorpel und angrenzenden Knochen im Verbund mit einem grünen Fluoreszenz Protein (GFP) mittels viraler Vektoren zu markieren und für eine definierte Zeit weiter zu kultivieren. Dieses Modell bietet die Möglichkeit, Chondrozyten und ihr Verhalten unter physiologischen, wie auch pathologischen Bedingungen zu untersuchen und nachzuvollziehen. Die Knorpelremodellierung ist bis dato noch kaum erforscht, und es gilt die Frage zu klären, ob Chondrozyten zur Knorpelregenerierung aus der Tiefe in die oberflächlichen Knorpelschichten wandern. Mithilfe von Frischzell-Bildgebung im Zeitraffer könnte man mit Hilfe dieses Modells markierte Chondrozyten in ihrem natürlichen Verband nachverfolgen. *In vitro*-Modelle bieten ebenfalls die Möglichkeit, mit verschiedenen Entzündungsmediatoren einen geschädigten Knorpel zu simulieren.

Summary

The aim of this study was to establish an *in vitro* organ culture model, which allows the study of chondrocytes and precursor cells and their ability of migrating through the subchondral bone and adjacent cartilage for remodelling. An *in vitro* organ culture model was created with viable cartilage and adjacent subchondral bone with GFP-highlighted cells. The GFP was transduced via viral vectors. This model allows to visualize viable cells in the natural habitat in physiological conditions and additionally allows the possibility to create and visualize the cells under pathological conditions. There is no comparable model like this at the moment which allows to follow viable cells over a certain time in their natural habitat in the cartilage/bone complex. This model could be a chance to proof the migration ability of cells in the cartilage and would be a further step to investigate and help to understand the mostly unknown cartilage remodelling.

1 Einleitung

Per definitionem beschreibt die Remodellierung im Allgemeinen die Veränderung einer Struktur, Form oder eines Aufbaus. Während man zum Thema Knochenremodellierung endlos viel Literatur zur Verfügung hat, ist über die Remodellierung von Knorpel mit dessen Zellen, den Chondrozyten, bis dato kaum etwas bekannt. Vor allem das Verhalten der Zellen in der mineralisierten, kalzifizierten Schicht des Knorpels wird in den Lehrbüchern nur marginal beschrieben oder sogar gänzlich übersprungen. Falls eine Reparation des Knorpels stattfindet, dann nur mit minderwertigem Faserknorpel, und das auch nur dann, wenn der Defekt bis auf den subchondralen Knochen reicht [1, 2]. Was aber passiert im Knorpel wirklich und wie verhalten sich die Chondrozyten bei Remodellierungsprozessen? Es gibt zahlreiche *in vitro*-Studien, welche allerdings immer Knorpel und Knochen separat behandeln (siehe Kapitel 2.2. Knorpelremodellierung). Bisher ist keine Studie bekannt, in der die Zellen in der vitalen Einheit Knochen/Knorpel markiert und ebenfalls in dieser Einheit evaluiert wurden, um eine eventuelle Bewegung der Chondrozyten beobachten zu können. Denn spätestens bei der histologischen Auswertung und Aufbereitung der Proben wird Knochen und Knorpel stets separat behandelt [3]. Embryonal und auch anatomisch hängen der subchondrale Knochen und Knorpel eng zusammen, was darauf schliessen lässt, dass auch Remodellierungsprozesse nur im Bezug auf die ganze Einheit zu untersuchen sind und eng miteinander zusammenhängen könnten [4]. Was, wenn Knorpel und Knochen sich genauso verhalten wie regenerierende Haut oder Darm? In den tieferen Schichten werden neue Zellen gebildet, ausdifferenziert und wandern in die oberen Schichten zur Regeneration. Wieso sollte der Knorpel hier eine Ausnahme bilden? Was, wenn die mesenchymalen Stammzellen (MSC) vom subchondralen Knochen durch die kalzifizierte Zone die Grenzlinie durchbrechen, sich in dieser Zeit zu Chondrozyten differenzieren und durch den Knorpel wandern, um sich so bei veränderter Belastung unter physiologischen Umständen sowie bei Knorpelschäden neu zu organisieren und den veränderten Bedingungen anzupassen? Immer mehr rückt der Knorpel und der angrenzende subchondrale Knochen als funktionelle Einheit in den Fokus [4]. Dies lässt vermuten, dass der Knorpel doch Fähigkeiten besitzt, sich zu remodellieren. Mit einem geeigneten Modell könnte dieses Remodellierungsverhalten und insbesondere die Zellbewegung in der komplexen Einheit über Zeit nachgewiesen werden.

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines *in vitro* Modells zur Untersuchung der Knorpelremodellierung um die Hypothese von migrierenden Chondrozyten innerhalb des Knorpel zu untersuchen. Es sollte ein Modell entwickelt werden, welches Knorpel und angrenzenden Knochen als ganzen Komplex untersucht und es zusätzlich ermöglicht die einzelnen Zellen der verschiedenen Zonen zu markieren und über einen längeren Zeitraum in ihrem physiologischen Verband beobachten und verfolgen zu können.

1.2 Versuchsanordnung

Vom Schaf wurde direkt nach dem Tod vom Humeruskopf aus dem Schultergelenk osteochondrale Explantate entnommen und über eine definierte Zeit kultiviert. Die Tiere waren zwischen 8 und 36 Monate alt. Um im späteren Verlauf Remodellierungsprozesse verfolgen zu können, wurden die Zellen mittels viraler Vektoren transduziert. Diese Vektoren sind in der Lage eine für grünes Fluoreszenz Protein (GFP) codierende Nukleinsäure-Sequenzen ins Genom der Zielzelle zu integrieren. Aufgrund der Expression von GFP nach erfolgreicher Integration des entsprechenden Transgens können grün fluoreszierende Zellen unter einem Fluoreszenz Mikroskop sichtbar gemacht werden. So sollte es später möglich sein, die Remodellierungsprozesse am lebenden Knorpel, beim gesunden wie auch beim geschädigten, genauer zu betrachten und nachzuvollziehen, wie sich Chondrozyten verhalten.

2 Literaturübersicht

2.1 Gelenkknorpelaufbau

Das synoviale, oder auch echte Gelenk stellt ein Verbindungsglied zwischen zwei angrenzenden Knochen dar, ermöglicht so eine schmerzlose und nahezu reibungsfreie Bewegung, dient dabei der Stossdämpfung und gewährleistet ein geschmeidiges Gleiten der Gelenkflächen zueinander. Die Gelenkflächen sind mit hyalinem Knorpel ausgekleidet, welcher avaskulär und aneural seine Nährstoffe einerseits durch Diffusion vom angrenzenden subchondralen Knochen, sowie über die Synovialflüssigkeit erhält. Bei jungen Tieren erscheint der Gelenkknorpel bläulich-weiss und wird mit zunehmendem Alter zellärmer und von gelblicher Farbe. Der Knorpel kann in mineralisierten und unmineralisierten Knorpel unterteilt werden. Der direkt angrenzende subchondrale Knochen ist ein Verbindungsglied zwischen spongiossem Knochen und mineralisiertem Knorpel und dient unter anderem dazu einen Grossteil der Kräfte abzufangen.

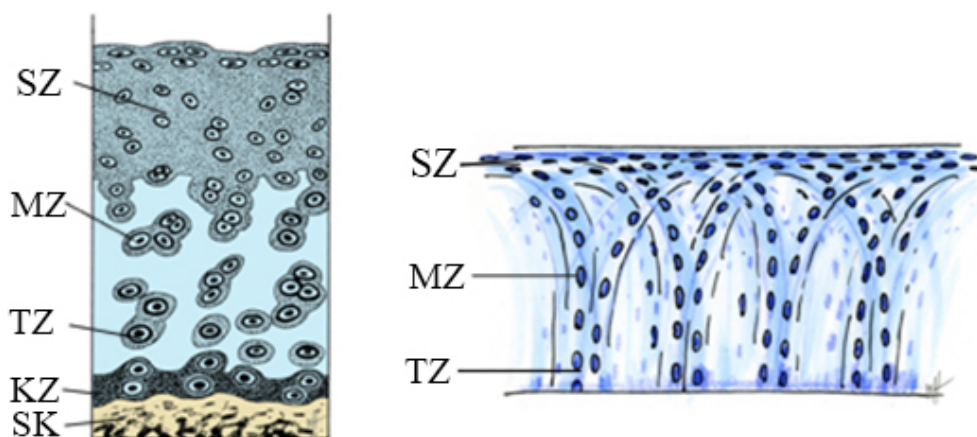


Abb. 1: Überblick Knorpelaufbau; rechtes Bild: die unterschiedliche Dichte, Grösse und Anordnung der Chondrozyten in der superfizialen Zone (SZ), mittleren Zone (MZ), tiefen Zone (TZ), kalzifizierten Zone (KZ) und im subchondralen Knochen (SK); linkes Bild: Zeigt schematisch den Kollagenfaserverlauf im hyalinen Knorpel; Zeichnung: Matthias Haab, wissenschaftlicher Illustrator, Department für Pferde, Vetsuisse Zürich

2.1.1 Unmineralisierter Knorpel

Der hyaline Knorpel besteht zu 60-80% aus Wasser, mit zunehmendem Alter abnehmend, bis zu 10% aus Chondrozyten, welche in der extrazellulären Matrix in kleinen Gruppen in Lakunen sitzen. Kollagenfasern (90% Kollagen Typ II, Kollagen IX) und Proteoglykane, welche von Chondrozyten synthetisiert werden und einerseits das Wasser binden, bilden den Hauptbestandteil der Makromoleküle der extrazellulären Matrix und ermöglichen die Stabilität des Knorpels. Im Knorpel herrschen hypoxische Bedingungen, welche an der superfizialen Schicht von 10% bis zu unter 1% in den tieferen Schichten reicht [5, 6]. Mit zunehmenden Alter nimmt die mitotische Aktivität der Zellen ab [7]. Sie sind, je nach Schicht, in unterschiedlicher Zahl, Form und Anordnung angesiedelt. Das Gerüst des Knorpels bilden die Kollagenfasern, welche bogenförmig angeordnet sind, sodass man in den oberen Schichten parallel angeordnete Fasern findet und in der tieferen Zone senkrecht zur Knorpeloberfläche verlaufen (siehe Abb. 1). Die Oberfläche bildet die superfiziale Zone mit der höchsten Chondrozytendichte mit spindelförmigen Zellen tangential zur Oberfläche angeordnet. Darauf folgt die mittlere oder auch tangential Zone, welche leicht abgerundete Chondrozyten beherbergt. In der tiefen oder auch radiären Zone ordnen sich die abgerundeten Zellen im säulenförmigen Aufbau von 5-8 Stück an. Die Chondrozyten orientieren sich hierbei an dem Verlauf der Kollagenfasern, welche als Gerüst zur Stabilität des Knorpels dienen [8].

2.1.2 Mineralisierter Knorpel

Die basophile Grenzlinie schliesst sich der tiefen Zone an und ist eine Art Abgrenzung von nicht-mineralisiertem zu mineralisiertem oder auch kalzifiziertem Knorpel. Diese ist histologisch als basophile Linie sichtbar. Basophil bezeichnet die Eigenschaft von Zellbestandteilen sich mit basischen Färbungen anzufärben, beispielsweise Hämatoxylin. Sie bildet sich erst im Laufe der Zeit aus und muss nicht durchgängig sein. In der Humanmedizin wurde die Ausbildung mehrerer Grenzlinien als Zeichen von osteoarthrotischen Veränderungen angesehen, doch mittlerweile ist bekannt, dass dies nicht zwingend der Fall sein muss und es bei der Ausbildung von mehreren Grenzlinien speziesspezifische Unterschiede gibt [9, 10]. Der kalzifizierte Knorpel (auch mineralisierter Knorpel genannt) ist in der Literatur nur marginal beschrieben im Vergleich zum unmineralisierten Knorpel. Es wird angenommen, dass diese Schicht ein Überbleibsel der enchondralen Ossifikation und damit ein Überbleibsel der

Wachstumsfuge darstellt. In der Wachstumsfuge produzieren hypertrophe Chondrozyten in der Wachstumsphase Matrixvesikel, welche die umliegende Matrix kalzifizieren und zusätzlich Kollagen X synthetisieren [9, 11, 12]. Es bleibt immer noch unklar, ob die hypertrophen Chondrozyten in der kalzifizierten Schicht der Wachstumsphase alle apoptotisch sind, oder teilweise sogar überleben und sich zu Osteoblasten differenzieren [13]. Hingegen bei der Übergangszone des Knorpels, sind die Zellen in der kalzifizierten Knorpelzone nicht apoptotisch und auch nicht hypertrophiert. Sie produzieren lediglich ebenfalls Kollagen Typ X, vor allem beim osteoarthritischen Knorpel [11]. Es wird davon ausgegangen, dass die Funktion der mineralisierten Zone die Übertragung der einwirkenden Kräfte auf den Knorpel zum Knochen ist und somit ein Verbindungsglied zwischen den Zonen darstellt.

2.1.3 Subchondrale Knochen

Direkt angrenzend befindet sich der subchondrale Knochen, welcher zusammen mit dem Knorpel für die Ableitung komprimierender Kräfte auf die kortikalen Knochen verantwortlich ist. Der subchondrale Knochen und der kalzifizierte Knorpel sind durch die sogenannte Zementlinie getrennt (Siehe Abb. 1). Die Struktur, Dichte und Grösse des subchondralen Knochens hängt stark mit der Lokalisation im Gelenk zusammen und kann seine Struktur, durch Remodellierung, veränderten Bedingungen anpassen. Ein Netz von feinen Anastomosen durchzieht den Teil des Knochens und die Kapillaren reichen bis teilweise sogar noch in die kalzifizierte Schicht des Knorpels hinein [4]. Vom subchondralen Knochen aus gehen vereinzelt Kanäle durch und in die kalzifizierte Schicht. Die Kollagenfasern vom Knorpel sind nicht durchgängig zum angrenzenden Knochen[14].

2.2 Knorpelremodellierung

Remodellierung im allgemeinen beschreibt in der Medizin den Umbauprozess eines Gewebes. Dies erfolgt unter physiologischen Umständen als Antwort auf beispielsweise veränderte Belastung oder unter pathologischen Umständen als Antwort auf einen Defekt oder chronische Schäden des Knorpels als Teil des natürlich Reparaturvorgangs. Zum Thema Remodellierung im Knorpel findet man in der Literatur bis dato wenig bis keine Literatur, da es offenbar einfach noch nicht erforscht wurde. Es ist bekannt, dass einmal geschädigter Knorpel, je nach Grad und Ausmass der Schädigung in der Regel nicht zum Normalzustand regenerieren kann [2, 15]. Bei oberflächlichen Defekten,

welche nicht bis zum subchondralen Knochen reichen, ist keine Heilung zu erwarten. Bei tiefen osteochondralen Defekten, welche durch den gesamten Knorpel bis zum subchondralen Knochen reichen, entsteht eine Blutung, bei welcher MSC's aus dem Knochenmark austreten. In der Folge füllt das Blutkoagulum den Defekt als Fibrinklot aus. Schliesslich bildet sich daraus ein minderwertiger Ersatzknorpel, der in seiner Zusammensetzung durch einen erhöhten Gehalt an Kollagen Typ I dem Faserknorpel entspricht und sich durch verminderte Belastbarkeit und Stabilität gegenüber dem hyalinen Knorpel zeigt [16]. Die Reparatur durch Ersatzknorpel ist als Versuch einer Remodellierung zu verstehen. Auf dem Umstand, dass der Knorpel avaskulär ist, beruht daher auch die Meinung, dass der Knorpel nicht bzw. nur begrenzt regenerationsfähig ist [2, 17]. Dass beim Kontakt mit dem subchondralen Knochen Stammzellen in den Defekt einwandern, macht man sich bei der Mikrofraktur-Methode als Therapie zu Nutze. Die Mikrofraktur-Methode wurde aus der in den 50er Jahren entwickelte PRIDIE-Bohrung abgeleitet und in den 90er Jahren nach STEADMAN modifiziert [18]. Hier werden bei tiefen Knorpeldefekten zuerst der geschädigte Knorpel bis auf den subchondralen Knochen entfernt und dann mittels spezieller Instrumente mehrere kleine Löcher in den Knochen gestanzt, um den Stammzellen aus dem Knochenmark einen Zugang zum Defekt zu gewähren. Diese wandern nach und nach in das neu gebildete Gewebe ein und organisieren sich zu einem minderwertigen Ersatzknorpel [19]. Diverse chirurgische Eingriffe wie die Mikrofraktur-Methode sowie eine riesige Anzahl von diversen Hydrogelen, Stammzellen und Progenitorzellen, welche in Defekte eingebracht werden, werden ständig erneuert, verbessert und weiterentwickelt. Trotz einer riesen Anzahl an Therapiemethoden und neuen Entwicklungen, gelangen die wenigsten tatsächlich bis zur Anwendung im Menschen und keine Methode zeigte bis jetzt die gewünschten Ergebnisse, nämlich hyalinen Knorpel in Langzeitstudien zu bilden [15, 20, 21].

2.3 Chondrozytenmigration

In einzelnen Studien wird über das Migrationsverhalten von Chondrozyten publiziert. Die meisten beziehen sich hier allerdings auf reine Zellkultur- und nicht auf Organkulturexperimente. Im natürlichen Verband, sprich in der Knorpelmatrix mit angrenzendem subchondralem Knochen, sind bis dato nur wenige Studien beschrieben. In einigen Versuchen wurden sie *in vitro* vermehrt, markiert und dann in Defekte von osteochondralen Explantaten eingebracht, um eine Migration der Zellen zu zeigen, bis

dato aber ohne Erfolg [3]. *In Vitro* mit reinen Zelllinien, wurde sowohl mit nasalem Knorpel als auch mit hyalinem Gelenkknorpel die Fähigkeit der Migration von Chondrozyten nachgewiesen [22-26]. Nur im Verband selbst fehlt bislang der Beweis. Histologische Veränderungen der basophilen Grenzlinie bei geschädigtem Knorpel geben jedoch Hinweise auf ein Auswandern von Zellen vom subchondralen Knochen durch die kalzifizierte Zone [27]. Sogenannte „cutting cones“ bilden sich und durchbrechen die Grenzlinie, welche dadurch unregelmäßig in ihrer Form wird. Dies wiederum deutet auf Zellmigration aus den tieferen Schichten, wie dem subchondralen Knochen hin [27]. In den letzten Jahren wurde von mehreren Autoren sogenannte Chondroprogenitorzellen (CPZ) im Knorpel identifiziert. Diese unterscheiden sich insofern von MSC, dass sie bereits eine Stufe höher differenziert sind. Nachgewiesen wurden sie in verschiedenen Spezies in der Superficialschicht und im angrenzenden Gewebe von Gelenken wie Perichondrium und infrapatellarem Fettgewebe. Je fortgeschrittener die Gelenksveränderungen sind, desto mehr CPZ lassen sich nachweisen [28, 29]. Der Nachweis der Zellen sowie spezifischer Marker, welche auf eine aktive Zellmigration schliessen lassen, war das Ziel von diversen Studien. Auch mit GFP wurden CPZ markiert, um ein Migrieren der Zellen nachzuweisen [27]. In dem von Morales et. al. verfassten Review von 2007 wird deutlich gemacht, dass dies ein Gebiet ist, welches unbedingt ein grosser Bestandteil der weiteren Forschung im Bereich Knorpel sein sollte und besonderer Aufmerksamkeit bedarf [30]. Ebenso in einer *in vivo* Studie, wo ebenfalls die Migration der Chondrozyten beobachtet werden konnte [31]. Bis heute zeigte die wissenschaftliche Literatur jedoch wenig Reaktion auf diese Beobachtungen, bzw. Aufforderung diesem Umstand Beachtung zu zeigen.

2.4 Zellmarkierungen

Für Zellmarkierung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Zum einen gibt es die Möglichkeit, mit einer Vielzahl unterschiedlichster Proteine die Zellen zu markieren, die Übertragung von Fremd-DNA z.B. bei der Transfektion mit Plasmiden, zum anderen die Transduktion mittels viraler Vektoren. Relativ neu ist auch die Markierung von Zellen mittels Nano-Partikeln oder sogenannten „Quantum dots“. Mit diesen Methoden ist es möglich, die Zellen durch Fluoreszenzen mehr oder weniger stark, je nach Methode, leuchten zu lassen und somit zu detektieren [32]. Bis heute gibt es keine spezifische Zellmarkierung für Chondrozyten. Da sich Chondrozyten aus den gleichen mesenchymalen Vorläuferzellen differenzieren wie Osteozyten, Osteoblasten

und Osteoklasten, ist es bis dato noch nicht gelungen einen verlässlichen chondrozytenspezifischen Marker zu entwickeln. Im Knorpel finden wir unter physiologischen Bedingungen ausnahmslos den Chondrozyten und dessen Vorstufen als zelluläre Komponente, was wiederum die Detektion der markierten Zellen in dieser Region vereinfacht. Im Knochen finden wir die knochenspezifischen Zellen und dessen Vorstufen, sowie MSC. Möglichkeiten für das gezielte Erkennen einer gewünschten Zelllinie sind entweder die Züchtung und separate *in vitro* Markierung isolierter Zellen oder die Herstellung gefärbter histologischer Präparate und Zuordnung der Zellen zu einer bestimmten Region [3]. Die Auswahl der Farbstoffe und Substanzen für die Zellmarkierung bringt weitere Probleme mit sich. Zum einen braucht man für die Zellkultur eine Markierung, welche in keiner Weise die Vitalität der Proben beeinträchtigt, zum anderen braucht man eine verlässliche Markierung, welche auch über einen längeren Zeitraum besteht und nicht aktiv von den Zellen wieder ausgeschleust oder verstoffwechselt werden kann. Zudem sollte es möglich sein, die Zellen in ihrem natürlichen Verbund zu erreichen. Ein weiteres Problem, welches man vor allem bei Zellen mit niedriger Stoffwechselaktivität vorfindet, ist die Markierung von ruhenden Zellen, welche sich in der G₀-Phase, also der Ruhephase, befinden und sich nicht teilen. Viele Mechanismen der Markierung beruhen auf der mitotischen Aktivität, sprich die Zellen müssen aktiv sein um den Farbstoff mittels verschiedener Mechanismen aufzunehmen und sich somit anfärben bzw. markieren zu lassen [33]. Dies macht es vor allem im Bereich des Knorpels sehr schwierig, da die Chondrozyten bekanntlich wenig bis kaum aktiven mitotischen Stoffwechsel zeigen, und diese Aktivität zusätzlich noch mit dem Alter abnimmt (siehe Kapitel 2.1 Gelenkknorpelaufbau).

2.5 Virale Vektoren als Zellmarker

Modifizierte, rekombinante Viren, sogenannte virale Vektoren finden vor allem in der Grundlagenforschung und Gentherapie ihren Einsatz [34, 35]. Verwendet wird lediglich das Gerüst der Viren, die krankmachenden Komponenten werden durch mehrfache Deletion entfernt. Deletion beschreibt die Entfernung von Gensequenzen aus dem viralen Genom. Sie werden mit den gewünschten zu exprimierenden Nukleinsäuren bestückt, hier das GFP. Dies ermöglicht das Visualisieren der Gensequenz tragenden Zellen durch die grüne Fluoreszenz, mit Hilfe eines entsprechenden Fluoreszenz Mikroskops. Einige Virale Vektoren, z.B. Lentivirusvektoren, oder Adeno-assoziierte

Virus-Vektoren, können ihre Erbinformation und damit die GFP-Sequenz ins Genom der Zielzelle integrieren. Der einmal transduzierten Zelle ist es nicht möglich, die für GFP codierende Sequenz aus ihrem Genom zu entfernen oder das exprimierte GFP vollständig aus der Zelle zu entfernen, weil die Sequenz aufgrund des viralen Promoters immer wieder transkribiert wird, solange die Zelle lebt. Darüber hinaus wird bei der Zellteilung die Markierung an die Tochterzellen weitergegeben. Der Vorgang mittels viraler Vektoren gewünschte Gene in Zielzellen zu schleusen, wird als Transduktion bezeichnet. Es werden mittlerweile mehrere verschiedene virale Vektoren in der Forschung und Gentherapie verwendet, welche verschiedenste Gene in die gewünschten Zielzellen schleusen können. Wenn die Zellen über einen längeren Zeitraum markiert und nicht zerstört werden sollen, benötigt man replikationsdefiziente Vektoren. Eine wichtige Eigenschaft der viralen Vektoren ist, dass sie in der Latenzphase bleiben, sprich sie schleusen das gewünschte Gen in das Genom der Zelle, vermehren sich jedoch nicht. Ist das Virus jedoch replikationsfähig, gehen diese in den lytischen Zustand über. Sprich das Virus infiziert die Zelle, vermehrt sich bis diese zerstört wird und neue infektiöse Virionen freigesetzt werden, welche wiederum neue Zellen befallen können. Viele virale Vektoren können nicht nur sich teilende, sondern auch post-mitotische Zellen transduzieren. In der Gentherapie wird die Transduktion von Fremd-DNA mittels viraler Vektoren in Zellen am effizientesten im Vergleich zu den nicht-viralen Methoden angesehen [34].

2.5.1 Adeno-assoziiertes Virus und seine Vektoren

Das Adeno-assoziierte Virus (AAV) gehört zu der Gattung der Dependoviren innerhalb der Familie der Parvoviren. Dependoviren heissen sie, da sie ohne Helfervirus nicht replizieren können. Das AAV wurde erstmals 1960 als Kontamination eines Adenovirusstammes im Labor entdeckt. Es finden sich 11 bekannte Serotypen und über 100 Varianten, welche verschiedene Spezies befallen können [36]. Das Virion besteht aus einem ikosaedralen Kapsid, welches aus 3 Strukturproteinen VP1, VP2 und VP3 zusammengesetzt ist und einen Durchmesser von 20-25 nm besitzt und einer einzelsträngigen, linearen DNA mit einer Länge von 4,7 kb. Das Genom enthält an beiden Enden „inverted terminal repeats“ (ITRs) von 145 Nukleotiden Länge welche die Rep-Gene und die Cap-Gene flankieren. Damit ist das Genom des AAV relativ klein und für die Verwendung als Vektor steht nur eine beschränkte Transgenkapazität zur Verfügung [37]. Knapp 90 % aller Menschen sind latent infiziert, ohne dass eine

Erkrankung folgt [38]. In Abwesenheit eines Helfervirus kommt es zur latenten Infektion und das AAV integriert sich vornehmlich in das 19. Chromosom im Genom, oder liegt als Episom vor [39]. Klassischerweise wird, wenn ein Helfervirus genommen wird, ein Herpes Simplex Virus, Adenovirus oder Vacciniavirus verwendet. AAV-basierte Vektoren sind apathogen, zeigen eine stabile Langzeit-Genexpression und können zudem ein breites Spektrum an Zellen verschiedener Spezies transduzieren. In vorklinischen Studien wurden rekombinante Vektoren des AAV vor allem bei Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson, Morbus Canavan, Haemophilie B, zystische Fibrose, reumatoide Arthritis, und verschiedene Tumorarten getestet aufgrund der Affinität zu Zellen des zentralen Nervensystems, sowie zu Leberzellen. Die fehlende Pathogenität des AAV macht es zu einem geeigneten Vektor für die Gentherapie beim Menschen. Zielgewebe sind Leber, Retina, Gehirn und Lunge [34]. Erfahrungsgemäß braucht die Transduktion mehrere Wochen, da die einzelsträngige DNA des Vektorgenoms in der Zelle zuerst in eine doppelsträngige DNA kopiert werden muss, welche transkribiert werden kann. Problematisch kann die Aktivierung des Immunsystems sein und der Gentherapie entgegenwirken. Zum einen kann das Immunsystem Antikörper gegen die Vektoren, oder gegen die transduzierten Zellen bilden. Andererseits werden die AAV Vektoren als wenig problematisch in Betracht auf Aktivierung des Immunsystems beschrieben; dies ist jedoch grundsätzlich abhängig von der verwendeten Multiplizität der Infektion (MOI) und Administrationsroute [34]. Die MOI beschreibt das Verhältnis zwischen Viren und zu transduzierenden Zellen. Allerdings ist das Risiko der Aktivierung des Immunsystems bei AAV grösser, als bei anderen Vektoren, z.B. Lentivirus Vektoren, da im Vergleich zu Lentivirus die Mehrzahl der Menschen mit dem AAV Kontakt hatten [40, 41]. Eine weitere Gefahr der viralen Vektoren birgt die Integration in das Genom, da bei den meisten integrierenden Viren die Integration zufällig erfolgt und dies, je nach Stelle im Genom, adverse Effekte haben kann, z.B. die Aktivierung von Onkogenen. Hier wird AAV, im Vergleich zu anderen Vektoren, als relativ sicher beschrieben, da die Integrationsorte weitestgehend konstant sind [34]. Im Jahre 2012 wurde erstmals ein AAV-Vektor zur Behandlung der Stoffwechselerkrankung Lipoprotein-Lipase Defizienz von der Europäischen Arzneimittelbehörde zugelassen.

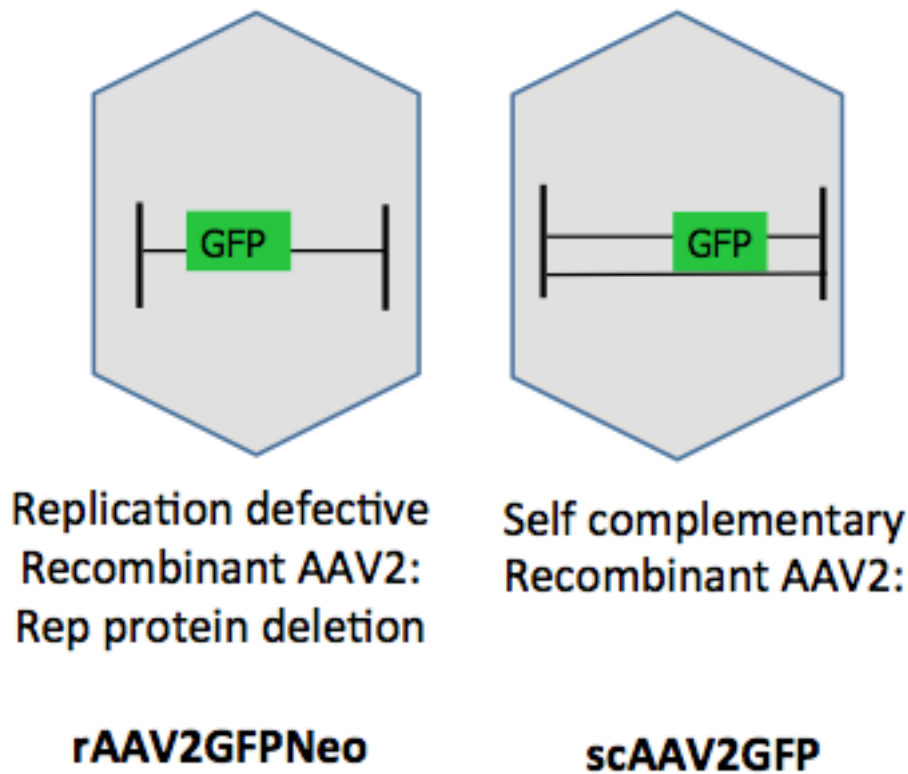


Abb. 2: Varianten des AAV-Vektors; links: rekombinanter AAVTyp2GFPNeomycin; rechts: selbkomplementierender AAVTyp2GFP Quelle: modifiziert nach Franzoso Francesca Dr.med.vet. dipl. ECVP, Vetvirologie, Vetsuisse Zürich

2.5.1.1 rAAV2GFPNeo

Dieser spezielle Typ ist ein rekombinanter, replikationsdefizienter Vektor vom AAV Serotyp 2 (rAAV2GFPNEO). Das Rep-Gen ist hier durch Deletion entfernt und mit einer GFP exprimierenden Sequenz ersetzt worden (siehe Abb. 2). Bei den rekombinanten Vektoren existiert nur noch das gewünschte Transgen, hier das GFP, flankiert von den ITR`s. Ist der entsprechende Vektor in die Zelle, nach Andocken an den Heparinsulfat-Proteoglykan Rezeptor und Endozytose, aufgenommen und das Vektor Genom in den Zellkern transportiert worden, muss die einzelsträngige Vektor-DNA in einen stabilen Doppelstrang umgewandelt werden. Dies benötigt, je nach Zelltyp, Stunden bis Wochen. Um diesen Schritt zu umgehen oder auch zu beschleunigen, gibt es eine selbstkomplementierende (sc) Vektorvariante .

2.5.1.2 *scAAV2GFP*

Die *scAAV* Vektoren umgehen den Schritt, der für die Genexpression nötigen Komplementärstrang-Synthese. Im Vergleich zum *rAAV* besitzt der selbstkomplementäre Vektor bereits die doppelsträngige DNA (siehe Abb. 2)[42, 43]. Der Vorteil ist eine viel früher einsetzende Synthese des Transgenen Produktes, während bei dem einzelsträngigen(ss)-*AAV* Vektor zuerst der Komplementär-Strang synthetisiert werden muss. Laut vorhandener Literatur ist eine stabile Langzeit-Expression des Transgenes im Vergleich zum *ssAAV* zu erwarten [44]. Nachteil hingegen ist allerdings die noch kleinere Kapazität des *scAAV* im Vergleich zum *ssAAV*[45].

2.5.2 Lentivirus und dessen Vektoren

Die Lentiviren bilden eine Gattung in der Gruppe der Retroviren. Sie besitzen charakteristischerweise die reverse Transkriptase und damit die Fähigkeit RNA in doppelsträngige DNA umzuschreiben. Es sind behüllte, einzelsträngige RNA-Viren mit 2 identischen RNA Molekülen. Lentiviren gehören zu den komplexen Retroviren und haben einen durchschnittlichen Durchmesser von 80-100nm und ein Genom von 7-12 kb Länge [46]. Sie lösen langsam fortschreitende, chronische Krankheiten aus. Laut Gefährlichkeitseinstufung gehört der Lentivirus-Vektor zur Biologischen Schutzstufe 2, da er rein theoretisch, durch mehrfache Rekombinationen, zu einem replikations-kompetenten und pathogenen Vektor werden könnte [35]. Der bekannteste Vertreter ist das Humane Immundefizienz Virus (HIV) mit der folgenden AIDS Erkrankung, bei den Equiden die Equine Infektiöse Anämie, Maedi-Visna bei den kleinen Wiederkäuern und beispielsweise noch das Feline Immundefizienz Virus bei den Katzen. Sie haben im Vergleich zu den *AAV* Vektoren eine grössere Transgenkapazität. Sie werden in der Gentherapie und für die Zellmarkierung in der Forschung verwendet, und haben sich nach langer Entwicklung und Forschung mittlerweile als fester Bestandteil für zukünftige therapeutische Applikationen etabliert. Nach vielen vorklinischen Studien sind die Lentiviralen Vektoren nun auch bis zu den klinischen Studien vorgedrungen [35, 47]. Es werden ruhende, wie auch aktiv teilende Zellen gleichermaßen effektiv transduziert [48]. In den vorklinischen Studien zeigten sich lentivirale Vektoren *in vivo* mit einer ausgeprägten Affinität zu Zellen des zentralen Nervensystems, wie Gliazellen, Oligodentrozyten, Astrozyten und adulte neuronale Stammzellen, des weiteren Hepatozyten und auch Stammzellen unterschiedlicher Art [49-51]. Für die letzteren sind

allerdings eine hohe Titerzahl nötig, welches klinisch die Problematik der Aktivierung von Onkogenen durch Vektorintegration ins Wirtsgenom erhöht [34, 52]. Problematisch kann *in vivo* die Aktivierung der humoralen und zellulären Immunantwort sein. Dies kann zur Beseitigung oder auch Ausschaltung der transduzierten Zellen, der Vektoren oder des Transgen-Produktes führen. Lentivirale Vektoren kommen nach vielen vorklinischen Studien vereinzelt schon in klinischen Studien an (bis jetzt noch wenigen) Patienten zum Einsatz, bisher im Bereich von Aquired Immundeficiency syndrome (AIDS), Parkinson und Adrenoleukodystropie (ALD), letzteres eine Krankheit des Nervensystems wobei es zur Demyelinisierung kommt [53, 54]. Man erhofft sich vor allem durch den Einsatz von Lentiviren in der Gentherapie viel für die Zukunft und Vorteile zum Beispiel gegenüber den AAV, da wenige mit Lentiviren exponierte Patienten vorkommen und damit immunologische Reaktionen weniger wahrscheinlich sind. Allerdings muss noch in Langzeitstudien die Sicherheit geprüft werden, um eine Onkogen-Aktivierung auf ein Minimum zu reduzieren oder möglichst ganz auszuschliessen.

2.5.2.1 Rekombinanter Lentivirus Vektor FUGW

Der lentivirale Vektor „Flip, ubiquitin promoter, GFP and WRE vector“ (FUGW), ist ein selbst inaktivierender (SIN) Vektor. Als Promotor für GFP wurde der humane Ubiquitin-C Promoter verwendet. Zusätzlich wurde das Murmeltier (woodchuck) Hepatitis Virus posttranskriptionale Regulatorische Element (WRE) hinter die GFP Sequenz kloniert, um die Transkriptionsrate zu erhöhen. Zwischen dem 5' Ende „long terminal repeat“ (LTR) und dem humanen Ubiquitin-c Promoter wurde zusätzlich das Humane Immundefizienz Virus - 1 Flap eingesetzt um einen höheren Vektortiter zu erreichen.

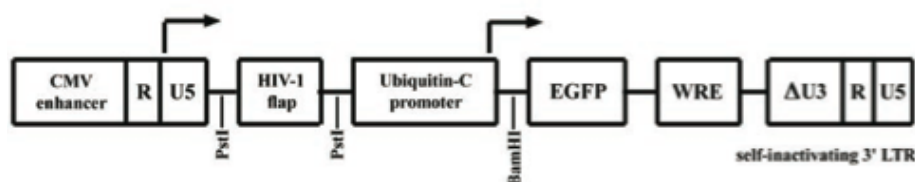


Abb. 3: Struktur des FUGW Vektors, Quelle: Carlos Lois,* Elizabeth J. Hong,* Shirley Pease, Eric J. Brown, David Baltimore; **2002**, Germline Transmission and Tissue-Specific Expression of Transgenes Delivered by Lentiviral Vectors

In-vivo konnte bei Transduktion mit dem FUGW Vektor bei Mäuseembryonen in den perivitellinen Raum nach 6 Wochen Lebenszeit bei 82% mindestens 1 Kopie des

integrierten Transgenes durch Southern Blot nachgewiesen werden und in 76% der Tiere konnte eine GFP Fluoreszenz beobachtet werden. In einem Folgeversuch waren es noch höhere Prozentzahlen. Es zeigte sich als ausreichend, wenn 2 oder mehr Proviren (ins Wirtsgenom eingebaute Vektorgenomkopien) GFP exprimierten, um dies im Fluoreszenz Mikroskop sichtbar zu machen. Diese Tiere waren GFP positiv in der Haut, Knochen, Lunge, Leber, Thymus, Milz, Magen, Niere, Gehirn, Retina und Gonaden. Es konnte jedoch eine starke Variabilität von integrierten Proviren bei den unterschiedlichen Tieren festgestellt werden, welches eine starke Variabilität und vor allem schlecht kontrollierbare Ergebnisse bedeutet [55].

2.6 Fixierung und Einbettungstechniken

Generell werden die Schnitte für histologische Untersuchungen entweder mit Paraffin oder mit Kunstharz eingebettet. Hat man in seinen Proben knöcherne Anteile müssen diese für die Paraffinschnitte erst einmal mittels Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) entkalkt werden. Die Entkalkungsdauer ist abhängig von Probengrösse und Tierart, bzw. der speziesspezifischen Knochenhärte. Das Schaf hat einen sehr harten Knochen, welcher im Schnitt selbst bei kleinsten Proben 2-3 Monate entkalkt werden muss. Problematisch ist die Behandlung von GFP positiven Proben zur Dünnschnitt-Herstellung für histologische Präparate. Die Standardeinbettungstechniken, wie die Paraffin- oder Kunstharzeinbettung, werden in der Literatur im Bezug auf GFP positive Proben gleichermassen als problematisch beschrieben. Unklar bleibt der genaue Grund für den Verlust der Fluoreszenz von GFP positiven Zellen nach Herstellung der Dünnschnitte [56, 57]. Bei Proben mit viel knöchernem Anteil bevorzugt man daher die Methylmetacrylat (MMA) bzw. Kunstharz-Methode, da hier ein Entkalken nicht notwendig ist. Die meisten Kunstharze im Handel haben eine Auspolymerisationstemperatur von circa 65° Celsius. Wenige Methoden stehen für eine kalte Auspolymerisation zur Verfügung, welche auch bei niedrigen Temperaturen auspolymerisieren können. Das Technovit 9100 ist so ein kalt auspolymerisierendes MMA und verspricht zudem laut Hersteller ebenso Immunhistochemie tauglich zu sein [58, 59]. Dies ist vor allem notwendig, wenn die entsprechenden Proben hitzelabile Proteine enthalten, da die meisten den hohen Temperaturen bei der Auspolymerisation nicht stand halten [60]. Bei der Auswahl der Einbettungstechnik spielen ebenso die weiteren Verfahren eine Rolle. Will man mit den Proben immunhistochemisch weiterarbeiten empfiehlt sich die Paraffineinbettung.

3 Material und Methoden

3.1 Aufbau der Studie

Für die Etablierung eines geeigneten Modells zur Erforschung der Chondrozytenmotilität bei Knorpelremodellierung wurden aus dem Schultergelenk (proximaler Humerus) vom Schaf osteochondrale Explantate direkt nach der Schlachtung bzw. der Euthanasie der Tiere entnommen [61]. Diese wurden *in vitro* durch virale Vektoren mit einem für GFP codierenden Gen in ihr Genom integriert, um so die Zellen zu markieren.

3.2 Tiere

Für dieses Projekt wurden keine Schafe getötet, sondern Tiere verwendet, welche aufgrund von anderen Projekten euthanasiert oder geschlachtet wurden. Alle verwendeten Tieren waren gesund, zwischen 18 Monaten und 3 Jahren alt und wiesen keinerlei sichtbare Knorpel- oder Knochenschäden in dem gewählten Bereich der Probeentnahme auf. Kranke oder infektiöse Tiere, oder solche mit unbekannter Erkrankung, wurden für dieses Projekt nicht verwendet.

3.3 Verwendete Chemikalien, Geräte/Instrumente, Verbrauchsmaterial

3.3.1 Chemikalien

(+)-Sodium L-Ascorbate 11140-50G Lot BCBM0369V (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)

(oder Migros-Milchpulver!)

40% Acrylamid/1% Bisacrylamid (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)

Adeno-assoziiertes Virus (AAV)-Typ2 NEO (Institut Virologie Francesca Franzoso, Universität Vetsuisse Zürich, Schweiz)

Agarose, low gelling temperature A9045-5g (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)

Aluminium oxide 90 active basic (Merck Millipore, Merck KGaA Darmstadt, Deutschland)

Ammonium persulfat (ASP) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)

Amphotericin B (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)

Ascorbinsäure (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)

Beta-Mercaptoethanol (ME) (Sigma-Aldrich, Bradford assay kit (Biorad))

Bromphenolblau (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)

Dibutyl phthalate (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)

Ditriothreitol,(DTT), (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)

Dulbeccos modified eagle medium DMEM/F12 D8437 (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)

Ethanol 70% (Thommen Furler, Rüti b. Büren, Schweiz)

Fetales Bovines Serum (FBS) (Life Technologies, Zug, Schweiz)

Formalin 4% gepuffert (Biosystems AG / J.T. Baker)

Glycerol (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)

Glycine (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)

Goat Anti-mouse IgG H&L (HPA) (Abcam plc, Cambridge, UK)

Hank's Balanced Saline Solution (HBSS) (Life Technologies, Zug, Schweiz)

Lentivirus (Institut Virologie Bruna de Andrade Pereira, Universität Vetsuisse Zürich, Schweiz)

Live/Dead Cell Viability Assay (Life Technologies, Zug, Schweiz)

Methanol (VWR International / Merck Chemicals)

Methyl methacrylate M55909-1L (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)

Milk powder (Blotting-Grade Blocker)(BioRad Laboratories, München, Deutschland)

NaCl 0.9% (Fresenius, Bad Homburg vor der Höhe, Hessen, Deutschland)

Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)

Perkadox 16, G425 (Grogg-Chemie AG, Stettlen, Schweiz)

Phosphate buffered saline (PBS) (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA USA)

Prolong Diamond Antifade (Life Technologies, Zug, Schweiz)

Protease inhibitor tablets, cOmplete ULTRA Tablets, EDTA-free (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)

Quickstart Protein Assay Kit 1 (BioRad Laboratories, München, Deutschland)

Salzsäure (HCl) (Fluka GmbH, Buchs, Schweiz)

Shandon-Mount Eindeckmittel (Life Technologies, Zug, Schweiz)

Sodium citrate tribasic dihydrate 71404-250G (Fluka GmbH, Buchs, Schweiz)

Sodium dodecyl sulfate (SDS)(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)

Technovit 3040 Pulver lot 013340 (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland)

Technovit 9100 (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland)

Technovit universal liquid 500ml (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland)
Tetramethylethyldiamin (TEMED) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)
Tri-Natriumcitrat Dihydrat (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) (BioRad Laboratories, München, Deutschland)
Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)
Trypsin-EDTA (Life Technologies, Zug, Schweiz)
Tween-20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurat)
Vetros Bone Putty (Biomedtrix, Boonton, NJ, Amerika)

3.3.2 Geräte und Instrumente

Ausgiessstation Leica EG1150 (Leica, Solms, Deutschland)
Bohrer mit Diamanthohlbohraufsatz (Draenert, München, Deutschland)
Confocal laser scanning microscope SP5 Resonant ADP (Leica, Solms, Deutschland)
Entwässerungsautomat Leica ASP 200 S (Leica, Solms, Deutschland)
Exakt- Diamantbandsäge (Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland)
Fluoreszenz Mikroskop EVOS FL Auto AMAFD 1000 (Life Technologies, Zug, Schweiz)
Inkubator Sanyo MCO-18AC (UV) (Sanyo Electric Co.; Ltd. Osaka, Japan)
Jet Lavage System (Firma Zimmer, Münsingen, Schweiz)
Mr Frosty (Nalgene, Sigma-Aldrich[®], Buchs SG, Schweiz)
Osteochondral Autograft/Allograft TransferSystem (OATS) (Arthrex, Naples, FL, Amerika)
pH-Meter (VWR International AG, Dietikon, Schweiz)
Precision Plus Protein WesternC standards (BioRad,
Rotationsmikrotom Leica RM2155 (Leica, Solms, Deutschland)

3.3.3 Verbrauchsmaterialien

Eppendorfröhrchen 1,5 ml (Eppendorf, Vaudaux-Eppendorf, Schweiz)
Kisol Folie (Kettenbach GmbH&Co.KG, Eschenburg, Deutschland)
Menzel-Gläser, geschnitten Mattrand 26x76mm (Life Technologies, Zug, Schweiz)
Menzel-Gläser, Deckgläser 24x50mm (Life Technologies, Zug, Schweiz)
Mikroröhrchen 1,5ml (Treff AG, Degersheim, Schweiz)
Pasteur Pipetten aus Glas (Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Deutschland)
Pipetten (2; 5; 10; 25; 50ml) (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Sterilfilter, 0.22 μ m, (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz)

Sterile Tücher, Gazen

Zellkulturtestplatten (6, 24, 96) (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz)

Zentrifugenröhrchen 15, 50 ml (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz)

3.4 Medien

Explantatmedium

Mediumbestandteile	Menge in Prozent %
DMEM/F12	88.8
FBS	10
Pen/Strep, 100x Stock: (100 U/ml Penicillin, 10 μ g/ml Streptomycin)	1
Vitamin C , 1000x Stock (25 μ g/ml)	0.1
Amphotericin b, 1000x Stock (5 μ g/ml)	0.1

Chondrozytenmedium

Mediumbestandteile	Menge in Prozent %
DMEM/F12	89
FBS	10
Pen/Strep, 100x Stock: (100 U/ml Penicillin, 10 μ g/ml Streptomycin)	1

MSC-Medium

Mediumbestandteile	Menge in Prozent %
DMEM (low glucose + glutamine 2mM)	89
FBS	10
Penicillin/Streptomycin, 100x Stock: (100 U/ml Penicillin, 10µg/ml Streptomycin)	1

Einfriermedium

Mediumbestandteile	Menge in Prozent %
DMEM (low glucose + glutamine 2mM)	70
DMSO	20
FBS	10

Live/Dead-Medium

Mediumbestandteile	Menge in Prozent %
DMEM/F12	88.7
FBS	10
Pen/Strep 100x Stock: (100 U/ml Penicillin, 10µg/ml Streptomycin)	1
Amphotericin b, 1000x Stock (5µg/ml) Für Tag 0 – Tag 7	0.1
Calcein AM, 4mM in Dimethylsulfoxid (DMSO)	0.1
Ethidium homodimer-1, 2mM in DMSO	0.1

3.5 Entnahme

Die Entnahme erfolgte unter sterilen Bedingungen in der Veterinäranatomie des Tierspitals Zürich, Universität Zürich. Die Vorderbeine wurden im Ganzen vom Körper abgetrennt, ohne das Schultergelenk zu eröffnen. Bei Schlachttieren waren die Tiere bereits gehäutet, bei Euthanasie wurden die Vorderbeine nur an der Stelle des Schultergelenkes durch einen Hautschnitt von der Haut freipräpariert und der Rest des Beines mittels eines sterilen Tuches abgedeckt. Die Probeentnahme folgte immer unmittelbar nach dem Tod der Tiere. Das Bein wurde im Bereich der Humerusdiaphyse in einem sterilen Tuch in einen Spannbock eingespannt. Mit einem Skalpell (Größe 3) mit 10er Klinge wurde das Schultergelenk eröffnet. Nach Durchtrennung der oberflächlichen Muskulatur wurde die Skalpell Klinge aufgrund von Sterilitätsgründen gewechselt und das Schultergelenk mit einem frischen Skalpell unter sterilen Bedingungen eröffnet. Die Proben wurden stets aus der Schultergelenkfläche vom proximalen Humerus entnommen (siehe Abb. 4). Unmittelbar nach Gelenkeröffnung wurde dieses kontinuierlich mit steriler Kochsalzlösung gespült, um ein Austrocknen des Knorpels zu verhindern. Für die Knorpelentnahme wurden verschiedene Methoden ausprobiert, um die für die weiteren Untersuchungen am besten geeignete Technik zu etablieren. Dabei galt es nebst der Etablierung einer möglichst reproduzierbaren Standardtechnik auch die Vitalität der Knorpelzellen und eine gut erhaltene Struktur des subchondralen Knochens, der kalzifizierten Knorpelzone inklusive Grenzlinie und der restlichen tiefen, mittleren und oberflächlichen Knorpelzonen zu erhalten. Alle Vorversuche wurden mit mindestens 6 Explantaten pro Versuch durchgeführt.

3.5.1 Explantatentnahme 1: Mit Luftdruck betriebener Bohrer

Die ersten Entnahmen erfolgten mit einem Luftdruck betriebenen Bohrer mit diamantbesetzten Hohlbohraufsatz mit 7,3mm Innen-Durchmesser. Gebohrt wurde ca. 10mm tief von der Gelenkfläche her im 90° Winkel durch den Knorpel und den angrenzenden Knochen. Während des Bohrens wurde das Gelenk und der Bohrer ständig mit kalter, steriler isotonischer Kochsalzlösung gekühlt. Mit Hilfe eines Osteotoms und eines Hammers wurden die Explantate aus dem Gelenk gemeißelt und sofort in sterilen 50 ml Röhrchen mit gekühltem Citratpuffer (HBSS+1xPen/Strep+55mM Natrium Citrat) gesammelt.

3.5.2 Explantatentnahme 2: Osteotom

Hierbei wurden die Proben mittels Flachmeißel-Osteotom aus der Gelenkfläche gehämmert und hatten dementsprechend eine rechteckige, jedoch keine standardisierte Form.

3.5.3 Explantatentnahme 3: Handbohrer

Hier wurde versucht, mit einem Handbohrer für Trepanationen mit 8mm Außendurchmesser die Proben aus dem Gelenk zu entnehmen.

3.5.4 Explantatentnahme 4: Osteochondrales Auto/Allograft System (OATS)

Die Entnahme erfolgte mit dem OATS der Firma Arthrex, womit Proben mit 8mm Durchmesser entnommen werden konnten. Ein Teil des Systems besteht aus einem runden Hohlmeißel, mit welchem die Proben rausgehämmert werden. Eine angepasste Schraube ermöglicht ein direktes Überführen der Proben in die entsprechenden sterilen Gefäße ohne zusätzliche Manipulation.

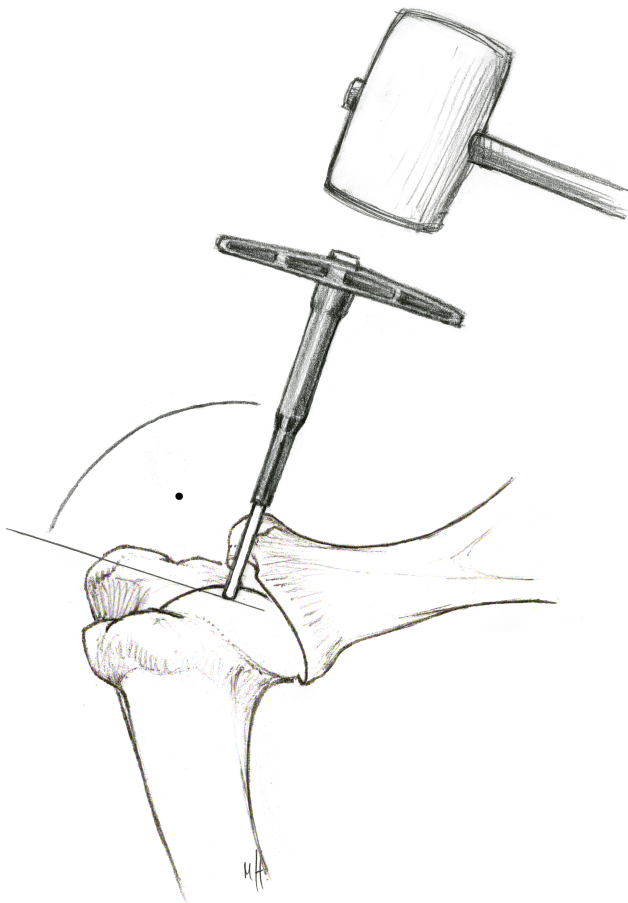


Abb. 4: Schematische Zeichnung der Entnahme mit dem OATS von Arthrex aus dem Humeruskopf vom Schaf; Zeichner: Matthias Haab, wissenschaftlicher Illustrator, Department für Pferde, Vetsuisse Zürich

3.6 Waschen

Die Proben wurden nach Gantenbein et al. Aufbereitet [62]. Die osteochondralen Explantate wurden unter sterilen Bedingungen auf einer Arbeitsbank in Zentrifugenröhrchen 2 mal mit je 30-35ml HBSS+1xPen/Strep gewaschen. Mittels dem Jet Lavage System wurden die Proben mit isotonischer Kochsalzlösung von losen Knochenstücken, Zell- und Geweberesten gereinigt. Nach zweimaligem Waschen in isotonischer Kochsalzlösung wurden die Proben auf dem Schüttler bei 250 Runden pro Minute (rpm) für 30 min mit HBSS+5xPen/Strep und anschließend in HBSS+1xPen/Strep + 55mM Natrium-Citrat für 15 min inkubiert.

3.7 Präparieren

3.7.1 Präparieren der Explantate: Vorversuch 1

Nach dem Waschvorgang wurden die Explantate ohne weitere Manipulation jeweils in sterile 6-Loch Zellkulturtestplatten überführt und mit 8ml Explantatmedium versorgt (siehe Kapitel 3.4 Medien). Pro Loch wurden maximal 5 Explantate gesetzt.

3.7.2 Präparieren der Explantate: Vorversuch 2

Die Explantate wurden in einer sterilen Arbeitsbank mit einem Rongeur am knöchernen Teil auf eine Höhe von 6mm (\pm 1mm) zurechtgeschnitten und gekürzt. Für die Virustransfektion wurden pro Explantat mit einem Kirschner Draht von 1,2mm Durchmesser jeweils 3 Löcher von der ossären Seite her gebohrt. Die Tiefe der Bohrlöcher wurde so gewählt, dass der subchondrale Knochen gerade erreicht wurde. Mittels Schieblehre wurde die Gesamthöhe der Explantate gemessen und als Standard 0,9mm abgezogen um ein Durchdringen des Bohrloches durch den subchondralen Knochen in den Knorpel zu verhindern. Die durchschnittliche Tiefe lag bei 5mm \pm 0.1mm.

3.7.3 Präparieren der Explantate: Vorversuch 3

Die Explantate wurden vor dem Waschvorgang mit der Exaktsäge unter möglichst sterilen Bedingungen gesägt. Sägeblätter und die Halterung wurden vor dem Schneiden mit Alkohol gereinigt und desinfiziert. Ziel war es, ein Explantat mit der gesamten Einheit Knorpel und subchondralen Knochen zu erhalten, und den spongiösen Teil des Knochens zu entfernen. Geschnitten wurde direkt unterhalb des subchondralen

Knochens parallel zur Knorpeloberfläche. Je nach Krümmung der Knorpeloberfläche hatten die Proben eine Gesamthöhe zwischen 1 -1,5mm.

3.7.4 Präparieren der Explantate: Vorversuch 4

Nach einmaligem Waschen der Explantate in HBSS+1xPen/Strep zum groben Beseitigen von Gewebs- und Blutresten wurden die Explantate unter sterilen Bedingungen in eine mit HBSS+1xPen/Strep gefüllte Petrischale gesetzt. Jedes Explantat wurde einzeln auf seine chondräre Seite gesetzt und seitlich mittels einer gebogenen Klemme am knöchernen Rand fixiert. Mit der anderen Hand wurde mit einem Rongeur von Hand der spongiöse Knochen so gut und viel wie nur möglich abgeknipst um ein Pellet nur mit Knorpel und subchondralen Knochen zu erhalten. Diese Knorpelpellets waren dann je nach Krümmung der Knorpeloberfläche zwischen 1-1,5mm dick.

3.7.5 Präparieren der Explantate (Knorpelpellets) aus Vorversuch 4

Die 1-1,5mm dicken Knorpelpellets wurden unter sterilen Bedingungen in einer Arbeitsbank in einer Petrischale mit der gebogenen Klemme seitlich am knöchernen Teil fixiert und mit einem Skalpell vorsichtig in möglichst dünne Längsschnitte geschnitten. Die Breite der Schnitte betrug zwischen 200-300 μ m.

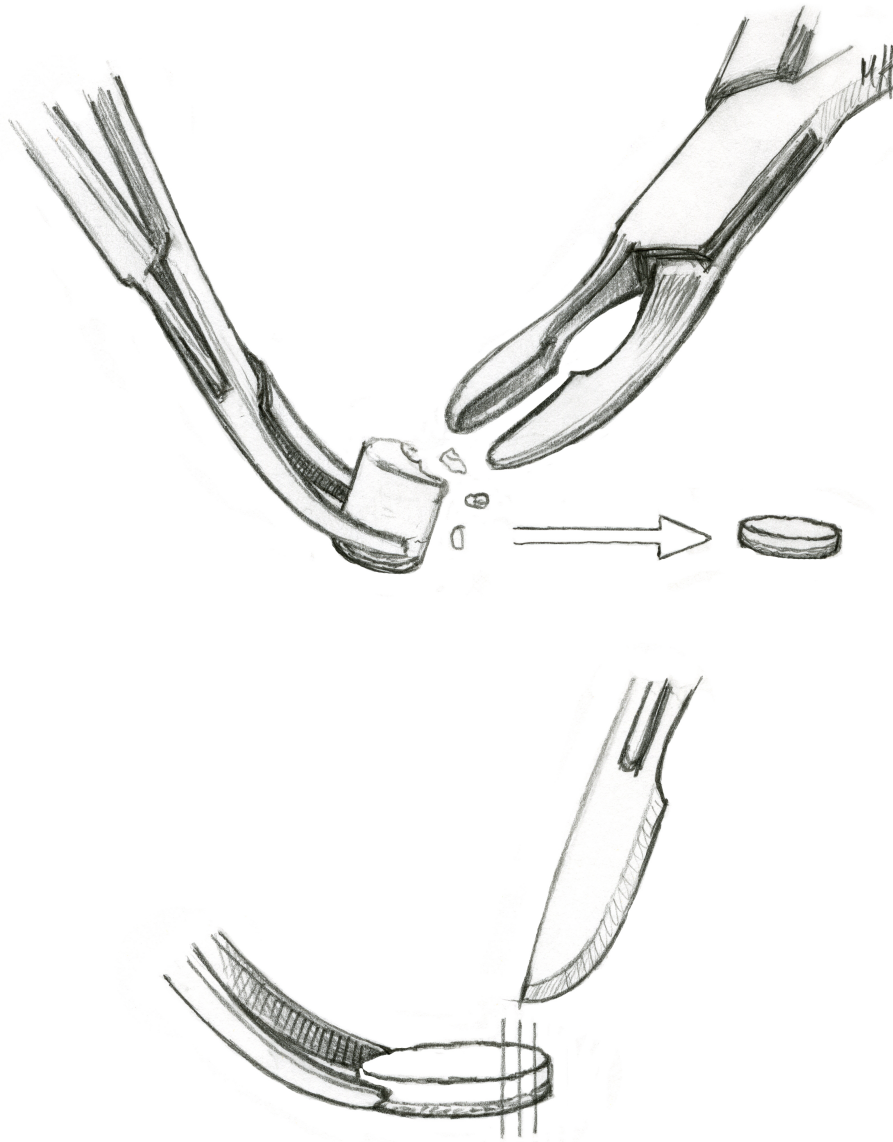


Abb. 5: Oberes Bild: Fixieren und kürzen der osteochondralen Explantate mit Klemme und Rongeur; Unteres Bild: Fixierung der Knorpelpellets mit Klemme und schneiden der Längsschnitte mit Skalpell; Zeichner: Abb. 1 Schematische Zeichnung der Entnahme mit dem OATS von Arthrex aus dem Humeruskopf vom Schaf; Zeichner: Matthias Haab, wissenschaftlicher Illustrator, Department für Pferde, Vetsuisse Zürich

3.8 Explantatkultur

Die Explantatkultur erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Proben wurden in einer 6-Loch Zellkulturtestplatte mit der knöchernen Seite auf den Plattenboden gesetzt und mit 8 ml Explantatmedium pro Loch in den Inkubator gestellt, bei 37° Celsius und 5% CO₂. Pro Loch wurden maximal 5 Explantate gesetzt. Das Medium wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Das alte Medium wurde mit einer Pasteurpipette vollständig abgesaugt, und mit einer Pipette frisches Explantatmedium in die Zellkulturtestplatten gefüllt. Für die ersten 7 Tage wurden das Explantatmedium mit Amphotericin B (5µg/ml) komplettiert,

um Pilzinfektionen vorzubeugen. Insgesamt wurden die Explantate 28 Tage kultiviert [61, 63].

3.9 Transduktion Zellen

Mit Hilfe viraler Vektoren wurde in das Genom der Zellen eine Gensequenz transduziert, welche dann ein grün leuchtendes Fluoreszenz-Protein codiert und somit die Zelle unter einem entsprechenden Fluoreszenz Mikroskop grün leuchten lässt (Siehe Kapitel: 2.6 Virale Vektoren als Zellmarkierung). Die viralen Vektoren stammten von dem Virologischen Institut der Vetsuisse Fakultät der Universität Zürich (Arbeitsgruppe Prof. Cornel Fraefel). Die Transduktion, sowie die Inkubation der Zellen erfolgte ebenfalls in den Laborräumen der Virologie. Es wurden zwei verschiedene virale Vektoren verwendet. Zum Einen ein lentiviraler Vektor, FUGW (siehe Kapitel 2.5.2 Lentivirus und dessen Vektoren), und zum Anderen ein Vektor der auf dem Adeno-assoziierten Virus basiert, AAV2GFPNEO (siehe Kapitel 2.5.1 Adeno-assoziiertes Virus und seine Vektoren). Die verwendeten Vektoren wurden zuerst an ovinen Chondrozyten und ovinen mesenchymalen Stammzellen (MSC`s) getestet um die nötigen Konzentrationen, verschiedene Virusvarianten und enthaltene Trägerstoffe auf Verträglichkeit in der Explantatkultur zu untersuchen. Des weiteren sollte auch gezeigt werden, dass die Viren die betreffenden Zellen im Explantat wirklich transduzieren können, da in der Literatur bis dato noch keine Explantate *in vitro* mit der GFP Gensequenz in der Organkultur transduziert wurden.

3.9.1 Vorbereitung Zellen

3.9.1.1 1. Ovine Chondrozyten

Die verwendeten Chondrozyten stammten aus einem früheren Projekt und waren bis dato in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für den damaligen Versuch wurden die ovinen Chondrozyten aus Bandscheiben von Schlachtschafen entnommen. Die benötigten Bandscheiben wurden unmittelbar nach dem Tod entnommen und in sterilen Gefäßen mit PBS und Gentamycin im Verhältnis 200:1 zum Labor transportiert, wo sie steril von überschüssigem Gewebe, Fett und Blutresten präpariert wurden. Nach zweimaligem Waschen mit frischer PBS/Gentamycin Lösung wurde das Verdauungsmedium, welches aus patentrechtlichen Gründen nicht bekannt ist aber auf enzymatischen Wirkungsweise beruht, dazugegeben und für 4 Stunden auf einem Schüttler inkubiert. Die weitere Isolation der Chondrozyten wurde vom damaligen

Projektpartner durchgeführt und ebenfalls aus patentrechtlichen Gründen nicht bekanntgegeben. Nach Ende des Versuches wurden die nicht verwendeten Zellen eingefroren. Das Chondrozytenmedium wurde aus der Zellkulturflasche vollständig abgesaugt und im Verhältnis 2:1 PBS und EDTA-Trypsin 0,25% hinzu pipettiert und löste somit die Zellen am Boden der Flaschen nach 3 min Inkubation durch leichtes Klopfen. Nach Zugabe von Chondrozytenmedium zu den Zellen, wurden diese gezählt und anschliessend bei 240rpm für 5min pelletiert. Die Zellen wurden im Einfriermedium (siehe Kapitel 3.4 Medien) in einer Konzentration von 1 Mio Zellen/ml resuspendiert und in entsprechend dafür vorgesehene Cryoröhrchen von 1 ml pipettiert. Die Röhrchen mit den Zellen wurden im Einfriermedium in einen speziell dafür vorgesehenen Einfriercontainer (Mr. Frosty, Thermo Scientific), gefüllt mit Isopropanol, gestellt und in den -80°Celsius Gefrierschrank transferiert. Nach 2 Tagen konnten die Kryoröhrchen entnommen und in einem speziell dafür vorgesehen Container in flüssigen Stickstoff überführt werden. Zur Wiederverwendung der Zellen für die Virustransfektion wurde ein Kryoröhrchen mit Chondrozyten aus dem Stickstofftank entnommen und in der Hand aufgetaut. Im Zentrifugenröhrchen wurden die Zellen mit Chondrozytenmedium resuspendiert. Nach Zentrifugation bei 250 rpm für fünf Minuten wurde der Überstand mittels Pasteurpipette abgesaugt und das Pellet in Chondrozytenmedium resuspendiert, in Zellkulturflaschen gegeben und bei 37° Celsius und 5 % CO₂ in den Inkubator gestellt. Alle 2-3 Tage wurde das Medium ersetzt. Am 7. und 9. Tag wurden die Zellen unter dem Mikroskop auf ihre Konfluenz untersucht, sprich die Beurteilung der Grösse des Zellrasens auf dem Zellkulturflaschenboden, und mittels Trypsin-EDTA 0,25% gesplittet sobald diese 90% betrug. Das alte Medium wurde abgesaugt und warmes Dulbeccos Phosphat gepufferte Kochsalzlösung mit 0,25% Trypsin-EDTA im Verhältnis 10:1 hinzu pipettiert und bei 37° Celsius für 3 Minuten inkubiert. Durch leichtes Klopfen der Zellkulturflasche wurden die Zellen voneinander und von der Gefässoberfläche gelöst und mit frischem Chondrozytenmedium resuspendiert. Je nach gewünschter Verdünnung wurden die Zellsuspensionen dann entsprechend auf mehrere Zellkulturflaschen aufgeteilt und erneut mit Chondrozytenmedium wieder aufgefüllt. Die Zellzählung erfolgte mit einem automatisierten Zellzählgerät (Countess, Life Technologies). Hierfür wurden Zellsuspension und 20% Trypanblau im Verhältnis 1:1 vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren vermischt und anschliessend die Hälfte der Gesamtmenge in eine Einwegzählkammer pipettiert. Das Gerät gibt die Anzahl vitaler Zellen pro ml

Zellsuspension an und hat dabei die Verdünnung mit Trypanblau bereits berücksichtigt. Der automatische Zellzähler zählte alle Zellen zwischen 8µm und 30µm. Für die Transduktion am folgenden Tag wurden je 500000 Zellen in je einem Loch einer 12-Loch Zellkulturtestplatte pipettiert. Bei 4.8×10^5 Zellen/ml wurden entsprechend pro Loch 1.042ml pipettiert.

3.9.1.2 2. *Ovine MSC`s*

Die verwendeten MSCs stammten ebenfalls aus einem anderen Projekt (MSRU0029). Diese wurden unter Vollnarkose durch eine Knochenmarkspunktion aus dem Beckenkamm der Schafe mittels Spritze entnommen und danach in Zentrifugenröhrchen mit Heparin (5000IE/ml) überführt im Verhältnis Knochenmark und Heparin 20:1. In einer sterilen Arbeitsbank wurde das Knochenmark 1:2 mit HBSS verdünnt und steril filtriert. In einem sterilen Zentrifugenröhrchen wurde auf Histopaque-1077 verdünntes Knochenmark im Verhältnis 1:1,25-1,75 geschichtet und bei 400rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Mittels Pasteurpipette wurde vorsichtig der über den roten Blutzellen befindliche weiss schimmernde „buffy coat“ abpipettiert, in ein separates Röhrchen überführt und im Verhältniss 1:2 mit kalter HBSS verdünnt. Dem zweimaligem Waschen mittels zehnminütiger Zentrifugation bei 400rpm für 5 Minuten folgt die Resuspendierung mit MSC-Medium in der Zellkulturflasche. Nach Projektende wurden die MSC`s wie die ovinen Chondrozyten in Flüssigstickstoff eingefroren (siehe Kapitel 3.9.1.1 ovine Chondrozyten). Die weitere Behandlung der Zellen erfolgte wie bei den Chondrozyten, lediglich wurde das MSC Medium statt des Chondrozytenmediums verwendet. Da MSCs sehr heterogen sind in ihrer Grösse, wurde bei der Zellzählung die Zahl aller vitalen Zellen zwischen 10µm und 60µm bestimmt.

3.9.2 Transduktion

Bei einer 12-Loch Zellkulturtestplatte wurden die Zellen in je 6 Löchern mit dem lentiviralen FUGW Vektor und in einer separaten Platte je 6 Löcher mit dem AAV2GFPNEO Vektor transduziert. Pro Loch mit 1ml des Zelltyps entsprechendem Medium. Die Zelldichte pro Loch betrug 500' 000 Zellen. Es wurden die jeweiligen viralen Vektoren mit verschiedenen MOI (multiplicity of infection) und Vektorvarianten zu den Zellen pipettiert. Nach zweistündiger Zentrifugation bei 32° Celsius und 1200rpm wurde der Überstand vorsichtig, durch leichtes Kippen der

Zellkulturtestplatten abgeleert, und die Zellen mit 1 ml Medium resuspendiert (siehe Kapitel 3.4 Medien). Die Zellen wurden 3 Stunden später alle mit komplettiertem Chondrozyten- bzw. MSC-Medium versorgt und im Inkubator bei 37° Celsius und 5% CO₂ inkubiert. Die erste mikroskopische Auswertung erfolgte 48 Stunden nach Transduktion.

Ovine Chondrozyten:

Well	Lentivirus	AAV
1	MOI 60 Chondrozytenmedium ohne Serum	AAVTyp2NEO Chondrozytenmedium ohne Serum
2	MOI 180 Chondrozytenmedium	AAVTyp2Neo+Wildtype Chondrozytenmedium ohne Serum
3	MOI 180 Chondrozytenmedium ohne Serum	AAVTyp2 sc Chondrozytenmedium
4	MOI 120 Chondrozytenmedium ohne Serum	AAVTyp2 sc + HSV Chondrozytenmedium ohne Serum
5	MOI 180 Chondrozytenmedium ohne Serum Mit Knochenkleber	AAVTyp2 sc + HSV Chondrozytenmedium ohne Serum Mit Knochenkleber
6	Kontrolle ohne Virus	Kontrolle ohne Virus

MOI: Multiplicity of Infection; SC: self complementary Virus; HSV: Herpes Simplex Virus

Ovine mesenchymale Stammzellen:

Well	Lentivirus	AAV
1	MOI 60 MSC-Medium	AAVTyp2Neo MSC-Medium ohne Serum
2	MOI 60 MSC-Medium ohne Serum	Wildtype MSC-Medium ohne Serum
3	MOI 180 MSC-Medium Virus mit Protamin	Sc MSC-Medium ohne Serum
4	MOI 180 MSC-Medium Virus mit Protamin	HSV Medium ohne Serum
5	MOI 180 MSC-Medium ohne Serum Mit Knochenkleber	AAVtyp2Neo MSC-Medium
6	Kontrolle ohne Virus	Kontrolle ohne Virus

MOI: Multiplicity of Infection; SC: self complementary Virus; HSV: Herpes Simplex Virus

3.10 Transduktion Explantate

Die Transduktion mit viralen Vektoren wurde in den Laborräumen des Virologischen Instituts der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich durchgeführt. Sowohl die Transduktion, als auch die Inkubation der virus-exponierten Explantate fand ausschliesslich in den dafür vorgesehenen Räumen der Virologie statt. Die jeweiligen nicht-transduzierten Kontrollexplantate wurden örtlich getrennt in einem Inkubator im Zentrum für klinische Studien der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich bei exakt gleichen Bedingungen inkubiert.

3.10.1 Vorversuch Transduktion Lentivirus 1

Die auf 6mm zurechtgeschnittenen Explantate wurden in einer Arbeitsbank unter sterilen Bedingungen mit der chondrären Seite nach unten in eine Petrischale überführt. Um ein Austrocknen des Knorpels zu verhindern wurde der Boden mit DMEM/F12 bedeckt, jedoch der ossäre Teil des Explantates unbedeckt belassen. Auf die ossäre

Seite der Explantate wurde vorsichtig 30µl Virus pipettiert, anschließend 20 min gewartet bevor die Proben wieder in eine 6-Loch Zellkulturtestplatte mit 8ml Explantatmedium ohne Serum gesetzt wurden, sodass die Explantate wieder komplett mit Medium bedeckt waren. 24 Stunden später wurde das Explantatmedium ohne Serum durch komplettiertes Explantatmedium ersetzt.

3.10.2 Vorversuch Transduktion Lentivirus 2

Dafür wurden die Explantate mit den 3 Bohrlöchern an der knöchernen Seite verwendet. Diese wurden auf einer mit wenig bodenbedeckendem DMEM/F12 beschichtete Petrischale mit der chondralen Seite nach unten platziert. Pro Bohrloch wurden je 10µl des Vektors in das Explantat pipettiert, insgesamt 30µl. Die Bohrlöcher wurden mittels Knochenkleber (Vetros Bone Putty, Biomedtrix, Boonton, NJ, Amerika) verspachtelt. Bestehend aus speziellen Bioglasfaser-Partikeln mit Phospholipiden als Trägermaterial. Laut Hersteller resorbiert sich der Kleber *in vivo* nach 5-7 Tagen. Erfahrungen in der Zellkultur sind bis dato nicht bekannt. Die Explantate wurden wieder auf der chondralen Seite in eine 6-Loch Zellkulturtestplatte platziert, wo ebenfalls je 1ml DMEM/F12 hinein pipettiert wurde. So wurden die Explantate bei 1200 rpm für 2 Stunden bei 32° Celsius zentrifugiert.

Nach zweistündiger Zentrifugation wurden die Explantate entnommen und auf die ossäre Seite in eine neue 6-Loch Zellkulturplatte gesetzt und mit 8ml Explantatmedium ohne Serum versorgt. 24 Stunden nach Transduktion wurde das serumfreie Medium abgesaugt und mit Explantatmedium ersetzt.

3.10.3 Vorversuch Transduktion Lentivirus 3

In 6-Loch Zellkulturtestplatten wurden je 3ml niedrig-Temperatur-gelierendes Agarose Gel 2% gefüllt. Kurz vor dem Aushärten der Agarose wurden die Explantate mit der chondralen Seite komplett in der Agarose versenkt, sodass lediglich der knöcherne Teil hervor stand. Wie vorher beschrieben, wurden auch hier je 10µl Vektor pro Bohrloch hinein pipettiert, also 30µl pro Explantat. Diesmal wurden die Bohrlöcher nicht mit Knochenkleber verschlossen. So wurden die transduzierten Explantate eine Stunde inkubiert (37° Celsius, 5% CO₂), anschliessend mit je 8ml Explantatmedium ohne Serum versorgt und über Nacht inkubiert. 24 Stunden später wurden die Explantate aus der Agarose entfernt, in eine neue 6-Loch Zellkulturtestplatte auf die knöcherne Seite platziert und mit 8ml Explantatmedium pro Loch versorgt.

3.10.4 Vorversuch Transduktion Lentivirus 4

Diesmal wurden nur die im Durchmesser 8mm grossen Knorpelpellets verwendet, da sie anstatt 5-6mm nur eine Höhe von 1-1,5mm aufwiesen, welches die Transduktion der Zellen des subchondralen Knochens und tiefen Knorpelschichten erleichtern sollte. Die Pellets wurden auf der chondrären Seite in eine 24 Loch Zellkulturtestplatte gelegt, und die entsprechende Menge von 30µl Vektorlösung welche $1,6 \times 10^7$ genome containing particles (gcp) enthielt auf das Pellet pipettiert. Um ein Austrocknen des Knorpels zu verhindern wurden vorsichtig pro Loch 100µl Explantatmedium ohne Serum um die Probe herum pipettiert. Einer zweistündigen Zentrifugation bei 1200rpm folgte eine dreistündige Inkubation bei 37° Celsius und 5% CO₂. Eine Kontrollgruppe von zeitgleich transduzierten Pellets wurde nicht zentrifugiert. In jedes Loch wurden je 2ml Explantatmedium ohne Serum pipettiert. 24 Stunden später wurden die Proben mit einer Pinzette vorsichtig unter sterilen Bedingungen in eine 6-Loch Zellkulturtestplatte überführt und mit 8ml Explantatmedium versorgt.

3.11 Hauptversuch Transduktion

Der Hauptversuch erfolgte mit den etwa 200-300µm dicken Längsschnitten der Knorpel/Knochenpellets. Hier wurden von den Knorpelpellets von Hand geschnittene Längsschnitte mit einer Dicke zwischen 200-300µm verwendet und zusätzlich nochmals in der Mitte mit einer Skalpell Klinge geteilt, sodass jeder Schnitt eine Grösse von ca. 4mmx1-1,5mmx0,2-0,3mm hatte. Für die Transduktion mit den viralen Vektoren wurden die Schnitte in eine 96-Loch Zellkulturtestplatte gelegt und mit 200µl Explantatmedium versorgt. Zusätzlich wurde für jeden Tag je ein Kontrollschnitt angefertigt, welcher in einem örtlich getrennten Inkubator im Zentrallabor für klinische Studien der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich aufbewahrt wurde, um nicht in Kontakt mit den Virus-transduzierten Schnitten zu kommen.

3.11.1 Transduktion

3.11.1.1 Lentivirus Vektor FUGW

Pro Loch einer 96-Loch Zellkulturtestplatte wurden je 2 Schnitte mit insgesamt 30µl mit $1,6 \times 10^7$ gcp Virussuspension und 100µl DMEM/F12 versorgt, sodass die Schnitte vollständig mit Medium-Virussuspension eingedeckt waren. Nach dreistündiger Inkubation bei 37°Celsius mit 5% CO₂ wurde die restliche Virussuspension abgesaugt und mit 200µl DMEM/F12 + 1xPen/Strep aufgefüllt und zurück in den Inkubator

gestellt. 15 Stunden später wurden die Schnitte in eine 24-Loch Zellkulturtestplatte unter sterilen Bedingungen umgesetzt und mit 6ml Explantatmedium aufgefüllt. Am 1., 3. und 5. Tag wurden jeweils von jedem Schaf 2 Schnitte steril entnommen und in 4% gepuffertem Formalin fixiert und unter dem CLSM beurteilt.

3.11.1.2 rAAV2GFPNeo

Die Schnitte wurden je einzeln in einer 96 Loch Zellkulturtestplatte mit insgesamt 200µl Medium DMEM/F12 mit 10µl Virus eingelegt, sodass eine MOI von 1000 vorlag. Es folgten 30 min Inkubation bei 4° Celsius und darauf 23 Stunden bei Standardbedingungen. Insgesamt 24 Stunden später wurden die Schnitte steril in eine 6-Loch Zellkulturtestplatte umgesetzt und mit 6ml Explantatmedium versorgt. Die Schnitte wurden am 2., 3. und 5. Tag post transductionem im CLSM beurteilt, da der rAAV2GFPNEO Vektor mehr Zeit benötigt um Zellen transduzieren zu können, als der lentivirale Vektor. Pro Tag wurden den Testplatten unter sterilen Bedingungen jeweils 2 Schnitte entnommen, in einem Eppendorfröhrchen mit 4% gepuffertem Formalin fixiert und anschliessend mikroskopisch beurteilt.

3.12 Fixierung und Einbettung der Proben

Alle Explantate, oder Schnitte von diesen, wurden grundsätzlich zuerst in 4% gepuffertem Formalin fixiert. Dabei wurden die osteochondralen Explantate im Ganzen für mindestens 72 Stunden und die Längsschnitte mindestens 24 Stunden fixiert, bevor die Entwässerung begonnen wurde. Die Proben wurden in passenden und durch Alufolie lichtgeschützten Zentrifugenröhrchen für die Zeit der Fixierung auf dem Schüttler bei 75rpm gelassen. Bei den Vorversuchen für die verschiedenen Entnahmetechniken wurde die MMA Einbettung gewählt. Bei den ersten transduzierten Proben welche GFP positiv waren, wurde die MMA Technik durch ein kalt auspolymerisierendes Historesin (Technovit 9100) gewählt, um die Temperatur von 65° Celsius bei der Auspolymerisierung und somit ein Zerstören des GFP-Proteins zu verhindern.

3.13 Herstellung von MMA Schnitten

Zum Entwässern und Infiltrieren der Proben wurde der Leica Histoprocessor ASP200S verwendet. Die Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 7 Stunden bei 70%, 7 Stunden bei 90%, und 7, 7, 8 und 12 Stunden in 100% Ethanol bei

37° Celsius. Danach wurden die Proben je 3, 6 und 8 Stunden im Intermedium Xylol gelassen. Nach dem Histoprocessor wurden die Proben unter Vakuum 48 Stunden mit einem MMA Gemisch infiltriert. Zur Herstellung wurde Methacrylsäure-methylester, Perkadox 16 und Dibuthylphtalat im Verhältnis 89.5:10:0.5 mit einem Magnetrührer für 10 min gemischt und die einzelnen Proben in 20ml Gläser gefüllt. Nach zweitägiger Infiltration im Kühlschrank wurde das flüssige MMA in Teflonformen gegossen, mittels Schraubdeckel luftdicht verschlossen und 5 Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen bis das MMA vollständig auspolymerisiert war. Anschließend wurde mit frisch angerührtem Historesin (Technovit 3040 Pulver und Technovit Universalliquid) eine sechseckige Form (Höhe: 3cm, Seiten 1 und 2: 2,5cm, Seite 3: 2,2cm, Seite 4,5 und 6: 0,8cm) ausgegossen um die Proben später in dem Mikrotom einspannen zu können. Zum Anfertigen der Dünnschnitte wurden die aus den Teflon Formen gezogenen Probenblöcke einzeln in das Rotationsmikrotom Leica RM2155 zum Schneiden eingespannt. Es wurden jeweils 6µm dicke Dünnschnitte angefertigt, auf einen mit Chromgelatine beschichteten Objektträger aufgezogen, mit Kisolfolie abgedeckt und in einer kleinen Presse für 2 Tage bei 37° Celsius getrocknet.

3.14 Einbetten mit Technovit 9100

Das Technovit 9100 ist ein kalt auspolymerisierender Kunststoff auf Basis von MMA. Normales MMA wird während des Polymerisierungsvorganges bis zu 65° Celsius heiß, das Technovit 9100 hingegen wird im Kühlschrank bei -20 bis +4° Celsius ausgehärtet. In der Literatur wird es als mögliche Fixierungs- und Einbettungsmethode für Enzym- und Immunhistochemie beschrieben [58], sowie für GFP markierte Proben als geeignet empfohlen. Die Einbettung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die Entwässerung wurde ebenfalls im Leica Histoprocessor durchgeführt. Je 1 Stunde bei Raumtemperatur in aufsteigender Alkoholkonzentration beginnend mit 70%, 80%, anschliessend zwei mal 96% und abschliessend 3 mal in absolutem Alkohol bevor die Schnitte dann 2 mal für je 1 Stunde im Intermedium Xylol verbleiben. Nach diesem Schritt wurden die Proben aus dem Histoprocessor entfernt und in einzelne beschriftete Kassetten überführt. Für die Einbettung mit Technovit 9100 sollten generell nur Glasgefässe verwendet werden. Laut Hersteller beträgt die Zeit für die folgenden einzelnen Schritte jeweils mindestens 1 Stunde je nach Probengrösse. Für die Längsschnitte der osteochondralen Explantate wurde aufgrund der kleinen Grösse eine Dauer von 1 Stunde gewählt. Gestartet wurde mit der Präinfiltration 1, wobei hier die Schnitte 1

Stunde lang in einem Xylol Technovit 9100 Gemisch 1:1 bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Für die Präinfiltration 2 werden Technovit 9100 und Härter 1 im Verhältniss 200:1 mittels Rührstab vermengt. Ab Präinfiltration 3 erfolgt die weitere Infiltration mit entstabilisiertem Technovit. Dies ist notwendig, wenn man die Proben noch für spätere Immunhistochemie verwenden möchte. Die Entstabilisierung erfolgte, indem man eine Chromatographiesäule mit 50g Aluminiumoxid befüllt und das Technovit 9100 durchlaufen lässt. Ab diesem Schritt muss die entstabilisierte Lösung ständig gekühlt werden und darf sich nicht mehr über 4° Celsius erwärmen. Die Präinfiltration 3 ist identisch mit Präinfiltration 2, nur mit entstabilisierter Technovit 9100 Lösung und bei 4 Grad Celsius. Für die Infiltration werden entstabilisiertes Technovit 9100, Härter 1 und Polymethylmetacrylat (PMMA) Pulver im Verhältnis 10:0,8:0,04 vermengt und bei 4 Grad Celsius ebenfalls 1 Stunde inkubiert. Der letzte Schritt ist die Polymerisation, welche zum aushärten führt. Hierzu werden die Schnitte in der gewünschten Position in den Teflonformen platziert. Für die Polymerisation werden zwei Stammlösungen separat voneinander angefertigt und unmittelbar nach vermischen der beiden Lösungen mittels Glasstab verrührt und in die gewünschten Förmchen zu den Proben gegossen. Stammlösung A bestehend aus entstabilisiertem Technovit 9100, Härter 1 und Polymethylmetacrylat (PMMA) Pulver im Verhältnis 10:3,2:0,12 und Stammlösung B mit entstabilisiertem Technovit, Härter 2 und Polymerisationsregler im Verhältnis 10:0,8:0,4 werden vermengt und direkt nach verrühren in die Förmchen gegossen. Die Lösung sollte ca. 1cm hoch in den Formen stehen. Ein höheres Volumen führt zu einer verzögerten Auspolymerisation. Anschliessend werden die Teflonformen mittels Schraubdeckel verschlossen und bei -20° Celsius bis maximal 4°Celsius in den Tiefkühler bzw. Kühlschrank zum auspolymerisieren platziert. Frühestens nach 24 Stunden wird zum ersten mal getestet, ob das Technovit ausgehärtet ist und solange in der Form belassen. Sind die Proben ausgehärtet wird wie bei den MMA Schnitten vorgegangen (Siehe Kapitel 3.13 Herstellung von MMA Schnitten).

Stufe	Lösungen	Zeit/Temperatur
Präinfiltration 1	Xylol/ Technovit 9100 1:1 Gemisch	Mind. 1 Stunde bei Raumtemperatur
Präinfiltration 2	200ml Technovit 9100 + 1g Härter 1	Mind. 1 Stunde bei Raumtemperatur
Präinfiltration 3	200ml entstabilisiertes Technovit + 1g Härter 1	Mind. 1 Stunde im Kühlschrank bei 4°Celsius
Infiltration	Insgesamt 250 ml Technovit 9100 + 20g PMMA Pulver + 1g Härter 1	Mind 1 Stunde im Kühlschrank bei 4°Celsius
Polymerisation	Stammlösung A (Insgesamt 500ml Technovit entstabilisiert + 80g PMMA-Pulver +3g Härter 1) + Stammlösung B (Insgesamt 50ml: Technovit 9100 44ml + 4 ml Härter 2 + 2ml Polymerisationsregler)	Mind 24 Stunden zwischen -20°Celsius und +4°Celsius bis das Technovit vollständig ausgehärtet ist

3.15 Entplasten

Vor der Färbung ist ein Entplasten der hergestellten Dünnschnitte notwendig um den restlichen Kunststoff, welcher die Probe umgibt zu entfernen. Die Kisolfolien wurden entfernt, die Schnitte mit den entsprechenden Proben in Küvetten 3 mal 20 min in 2-Methoxyethylacetat gebadet, 2 mal 5 min in absoluten Ethanol-Bad dann je 3 min in absteigender Ethanol Reihe (96%,70%) und schließlich mit entionisiertem Wasser gespült.

3.16 Toluidinblau Färbung

Diese Methode färbt mineralisiertes Hartgewebe ungefärbt bis blassblau, Zellen Zellkerne, Osteoidsäume und Kollagenfasern blau und Mastzellgranula und lässt Knochenmatrix rotviolett erscheinen. Nach dem Entplasten wurden die Schnitte mit 0,7% Ameisensäure für 5 min angeätzt, dann in der warmen 0,1% Toluidinblaulösung für 10min gefärbt. Es folgte eine Spülung mit Leitungswasser, gefolgt von entionisiertem Wasser. Danach geht es in aufsteigender Reihenfolge vom 80% über 97% in den absoluten Alkohol, wo die Schnitte 5 min bleiben bevor sie einmalig in Xylol gespült und anschliessend 5min in Xylol inkubiert wurden. Anschliessend erfolgte das Einbetten der Schnitte.

3.17 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Diese Färbung färbt das Knochengewebe rot, Knorpel blau-violett und Zytoplasma rot bis blassrot. Nach dem Entplasten der Schnitte wurden diese für 60 min in Meyers Hämatoxylin gestellt, für 10 min vorsichtig mit fliessendem Leitungswasser gespült und danach für 20 min in lauwarmem Leitungswasser stehen gelassen. Anschliessend wurden die Proben für 7 min in Eosin-y-Phloxin gefärbt und in aufsteigender Alkoholreihe 80%, 96% und absolutem Alkohol gespült, 5 min im absoluten Alkohol stehen gelassen, danach in Xylol gespült und nochmals 5 min in Xylol gelassen bevor die Schnitte eingebettet wurden.

3.18 Einbetten der Schnitte

Mit einer Pinzette wurden die Schnitte einzeln aus dem Xylol gezogen und in eine Glasschale gelegt. Die mit Toluidinblau und Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte wurden mit genügend Eindeckmittel (Shandon-Mount) (je nach Grösse 2-3 Tropfen) vollständig bedeckt. Ein Deckglas mit passender Grösse zur Probe wurde kurz in Xylol getaucht und auf dem Objektträger platziert. Mittels einer Pinzette wurden vorsichtig die Luftblasen zwischen Deckglas und Objektträger rausgedrückt. Nach 30-minütigem Trocknen waren die Schnitte fertig zum Mikroskopieren. Die ungefärbten Proben für die Fluoreszenz wurden mit einem speziell für Fluoreszenzproben entwickelten Eindeckmittel beschichtet (Prolong Diamond Antifade).

3.19 Evaluation

3.19.1 Vitalitätsuntersuchung der Explantate von verschiedenen Verfahren der Probeentnahme

Die mit dem Luftdruckbohrer entnommen Explantate wurden am 1. Tag in der Zellkultur und dann in wöchentlichen Abständen auf ihre Vitalität kontrolliert und mittels konfokalem Laser Scanning Mikroskop (CLSM) evaluiert. Dies geschah mit der Tot-Lebend Färbung (Live/Dead-Staining Cytotoxicity Kit von, Life Technologies), wobei sich die lebenden Zellen grün und die toten Zellen rot anfärben. Die Vitalität der entnommenen Explantate wurde in wöchentlichen Abständen kontrolliert. Dies erfolgte über die Tod/Lebend-Färbung (LIVE/DEAD® Cell Viability Assay Kit, Calcein AM 40µl, 4mM in DMSO, Ethidium homodimer-1, 200µl, 2mM in DMSO; Fa. Molecular Probes, Thermo Fisher)[64, 65]. Dazu wurden die Explantate direkt aus der Zellkultur genommen und mit einer Exaktsäge sagittal in 300µm Schnitte gesägt, danach in je 300µl Färbe-Medium für 2 Stunden im Inkubator unter Lichtabschluss bei 37° Celsius und 5% CO₂ inkubiert. Zum Mikroskopieren wurden die Proben mit 1ml PBS in einer speziellen Glasbodenschale (IBIDI) im CLSM evaluiert. In der Literatur gab es noch keine Angaben, um Proben dieser Größe mit der Tod/Lebend-Färbung zu markieren, daher wurde zu Beginn der Färbungen die Proben nach 2, 4 und 6 Stunden Inkubation im Färbemedium verglichen. Als Negativkontrolle wurde jeweils 1 Schnitt für 30 min in 70% Methanol eingelegt, bevor er ebenfalls in dem Färbemedium inkubiert wurde. Die Proben wurden mit dem Trockenobjektiv mit 10-facher Vergrößerung betrachtet. Für die Visualisierung der lebenden Zellen wurde die grüne Fluoreszenz mit dem 488nm Argon Laser angeregt und mit dem Hybrid Detektor 2 (HyDs 2) auf einer Emissionsbandbreite von 493-570nm dargestellt, die rote Fluoreszenz der toten Zellen mit dem 561nm Laser angeregt und mit dem HyDs 4 auf einer Bandbreite von 565-700nm detektiert. Zusätzlich wurde der Photomultiplier Trans (PMT Trans) aktiviert, um eine Übersicht über die gesamte Struktur zu erhalten. Der Zoom war auf der niedrigsten Stufe 1,7 eingestellt. Um ein optimales Bild zu erhalten wurde beim Fotografieren ein „line average“ von 12 oder 36 gewählt. Es wurden 2D-Einzelbilder fotografiert, sowie mit Hilfe des Z-Stacks im Schnitt 100µm tiefe 3D-Aufnahmen der Schnitte angefertigt. Die Einstellungen variierten je nach Proben und mussten für jedes Bild einzeln angepasst werden.

3.19.2 Vitalität Längsschnitte

Hier wurden die Proben nicht mit der Exaktsäge für die Tot/Lebend-Färbung geschnitten, sondern direkt im entsprechenden Färbemedium inkubiert, da sie schon etwa dieselbe Größe wie die sonst geschnittenen Proben hatten. Sie wurden wie oben beschrieben mit der gleichen Konzentration Tod/Lebend-Färbung inkubiert, und ebenfalls unter dem CSLM evaluiert.

3.19.3 Toxizität Knochenkleber

Zur Überprüfung der Toxizität des verwendeten Knochenklebers Vetros Bone Putty von Biomedtrix wurde ebenfalls die Tod/Lebend-Färbung verwendet und die Explantate wie oben erwähnt in 300 μ m Schnitte gesägt. Dafür wurden Explantate mit Kleber und als Kontrolle Explantate ohne Knochenkleber behandelt und jeweils wöchentlich auf ihre Vitalität überprüft.

3.19.4 Transduktion

Hierfür wurde ebenfalls das CLSM benutzt und im GFP Kanal mit dem HyDs 2 Detektor bei 488nm angeregt und bei 493-570nm detektiert.

4 Resultate

4.1 Resultate Entnahme

4.1.1 Explantatentnahme 1: Mit Luftdruck betriebener Bohrer

Bei diesen Explantaten wurde schon am 1. Tag nach der Probeentnahme im Randbereich der Zellen entweder vermehrt tote, in der Tod/Lebend-Färbung rote, Zellen gefunden und teilweise waren sie auch vom Randbereich her dezellularisiert, was sich mit fortschreitender Zeit bis teilweise zur kompletten Dezellularisierung fortsetzte. Mit zunehmender Inkubation der Explantate waren im zentralen Bereich nur noch vereinzelte grün angefärbte Chondrozyten sichtbar.

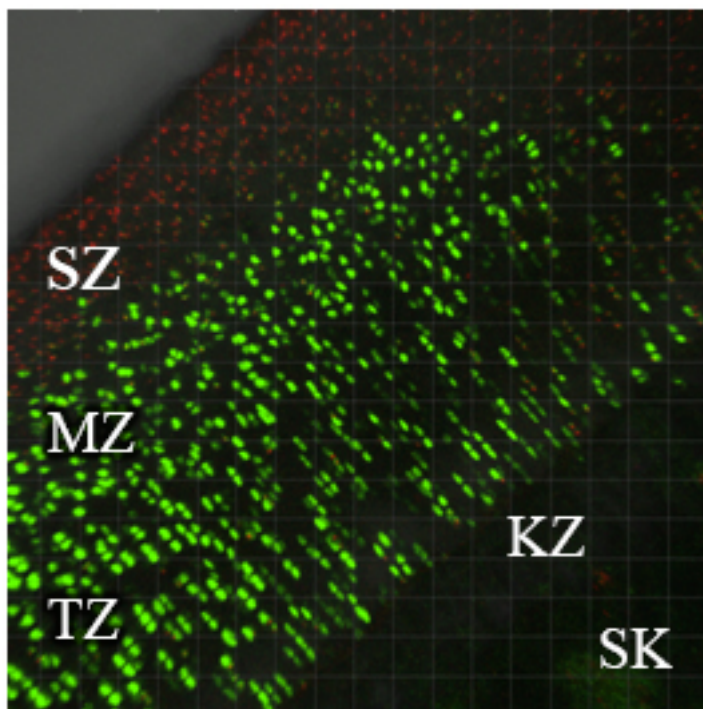


Abb. 6: Tod/Lebendfärbung von osteochondralem Explantat entnommen mit Luftdruck betriebenen Bohrer, mittlere und tiefe Zone mit grünen, lebenden Zellen, die Oberfläche ist abgestorben erkennbar durch die roten, toten Zellen; Aufnahme: CLSM; SZ: superfizielle Zone, MZ: mittlere Zone, TZ: tiefe Zone, KZ: kalzifizierte Zone, SK: subchondraler Knochen

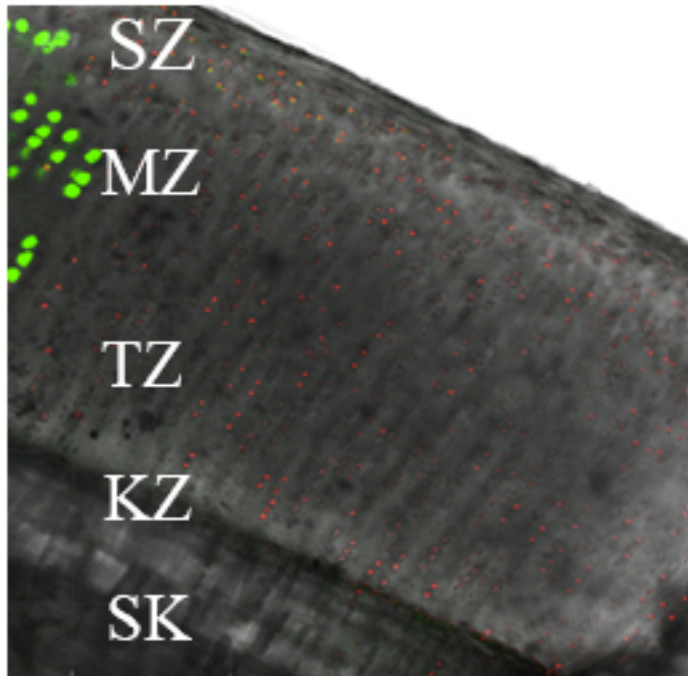


Abb. 7: Tod/Lebendfärbung von osteochondralem Explantat entnommen mit Luftdruck betriebenen Bohrer, Randbereich, wenig lebende, grüne Zellen, vermehrt tote, rote Zellen sichtbar; Aufnahme: CLSM; SZ: superfizielle Zone, MZ: mittlere Zone, TZ: tiefe Zone, KZ: kalzifizierte Zone, SK: subchondraler Knochen

4.1.2 Explantatentnahme 2: Osteotom

Mit dem Osteotom entnommene Explantate zeigten sich im Vergleich zu den mit dem Druckluftbohrer entnommenen durchgehend vital, auch im direkten Randbereich. Selbst bei Kontrollen am 30. Tag waren nur wenige bis keine toten Zellen sichtbar.

4.1.3 Explantatentnahme 3: Handbohrer

Aufgrund der extrem harten Knochensubstanz der Schafsknochen war es mit dem Handbohrer nicht möglich ein Explantat ohne Zerstörung der Knorpelschicht zu entnehmen. Durch die enorme benötigte Kraft durch den Knochen zu bohren rutschte man ständig ab und verursachte grobe Knorpelschäden, welche das Explantat für weitere Versuche unbrauchbar machten.

4.1.4 Explantatentnahme 4: OATS

Mit dem OATS konnten die Proben in standardisierter Größe von 8mm ohne Wärmeentwicklung aus dem Gelenk entnommen werden (siehe Abb. 4). Auch diese Proben wurden regelmäßig nach der Tod/Lebend-Färbung im CLSM betrachtet. Die Vitalität war bis Tag 28 bei allen untersuchten Explantaten hervorragend und keine bis wenige tote Zellen waren zu sehen.

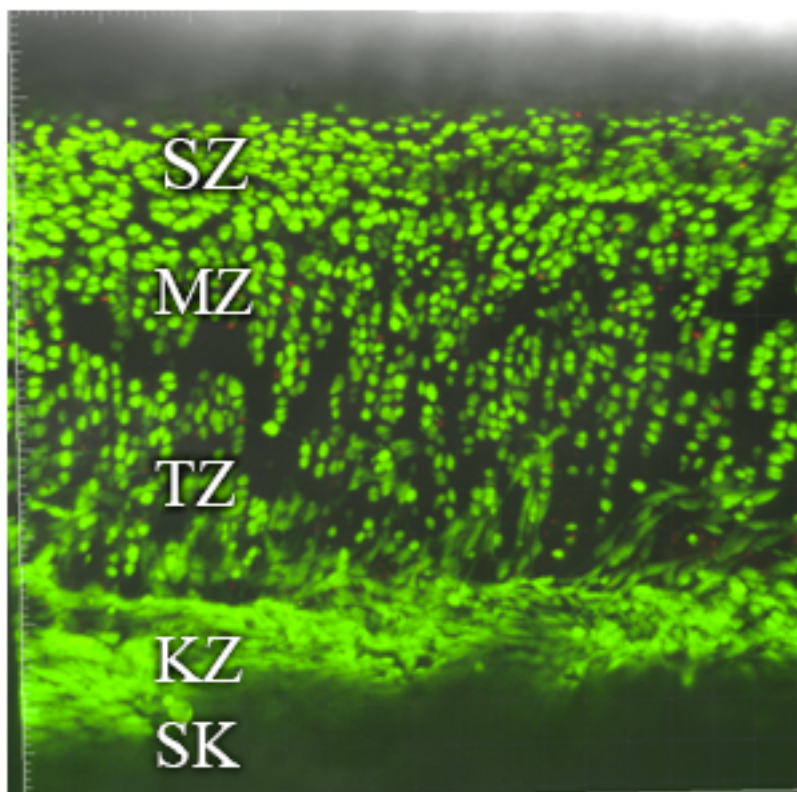


Abb. 8 Tod/Lebendfärbung eines Explantates entnommen mit dem OATS von Arthrex, durchgehend vitale, grüne Zellen, nur sehr wenig rote, tote Zellen im Vergleich zu anderer Entnahme; Aufnahme: OATS; SZ: superfizielle Zone, MZ: mittlere Zone, TZ: tiefe Zone, KZ: kalzifizierte Zone, SK: subchondraler Knochen

4.1.5 Präparieren der Explantate: Vorversuch 1

Weder die Bohrung mittels Kirschner Draht, noch das Zuschneiden mit dem Rongeur beeinflusste die Vitalität der Explantate negativ.

4.1.6 Präparieren der Explantate: Vorversuch 2

Das Zuschneiden der Explantate mit der Exaktsäge führte, trotz allen Bemühungen die Säge möglichst steril zu halten, zu Kontamination der Vitalpräparate und wurde deshalb abgebrochen.

4.1.7 Präparieren der Explantate: Vorversuch 3

Das Schneiden der Pellets von Hand mittels Rongeur und das Schneiden der einzelnen Sagittalschnitte per Hand mit einem Skalpell hatte keinen negativen Einfluss auf die Vitalität der Explantate.

4.2 Resultate Transduktion

4.2.1 Transduktion Zellen

In diesem Vorversuch zeigte sich, dass die Viren in serumhaltigem Medium nicht fähig waren die Zellen zu transduzieren. Der Knochenkleber wurde ebenfalls getestet und hatte keine negativen Auswirkungen auf die Transduktion. Alle Zellen wurden nach 48 Stunden betrachtet. Aufgrund der Ergebnisse der Zelltransduktion wurde mit dem lentiviralen Vektor FUGW, sowie mit dem rAAV2GFPNEO und scAAVGFP weiter gearbeitet. Für die Zeit der Virus-Inkubation wurde serumfreies Medium verwendet.

Abkürzung	Bedeutung
FBS	Foetales bovines Serum
Grün-unterlegte Löcher	Zellen nach 48 Std. GFP-positiv
HSV	Herpes Simplex Virus (Helfervirus)
Kkl.	Knochenkleber
Kontrolle	Zellen, welche nicht transduziert wurden
MOI	Multiplizität der Infektion
W	Mit
w/o	Ohne
Weiss-unterlegte Löcher	Zellen nach 48 Std. GFP-negativ
Wild Typ AAV	

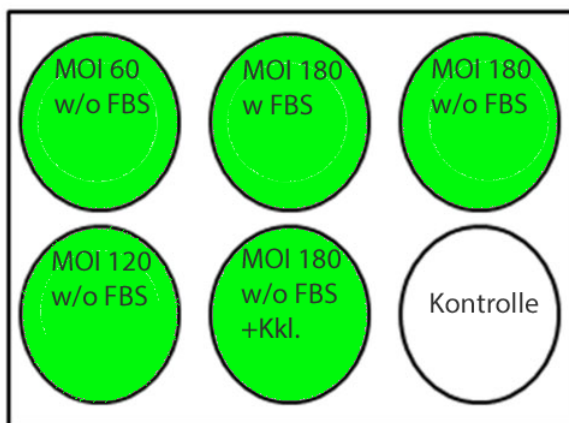


Abb. 9: Ovine Chondrozyten mit Lentivektor FUGW, Grün: Fluoreszenz positiv, Weiss: keine Fluoreszenz

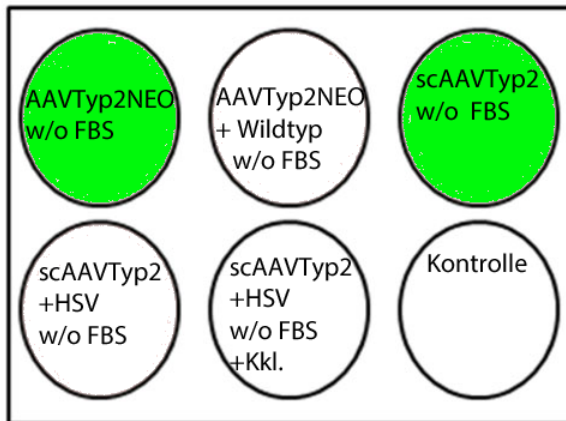


Abb. 10: Ovine Chondrozyten mit verschiedenen Varianten des AAV, Helferviren; Grün: Fluoreszenz positiv, Weiss: keine Fluoreszenz

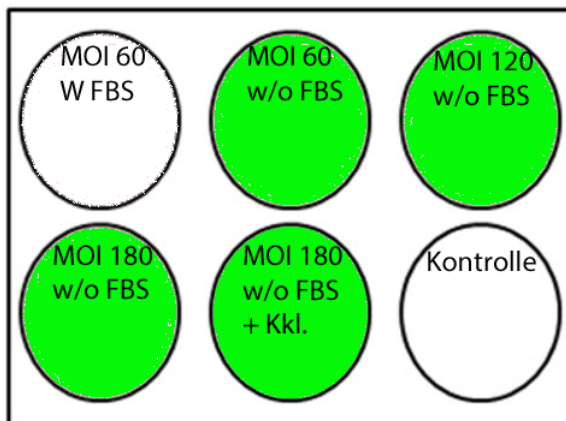


Abb. 11: Ovine MSC's mit Lentivirus FUGW; Grün: Fluoreszenz positiv, Weiss: keine Fluoreszenz

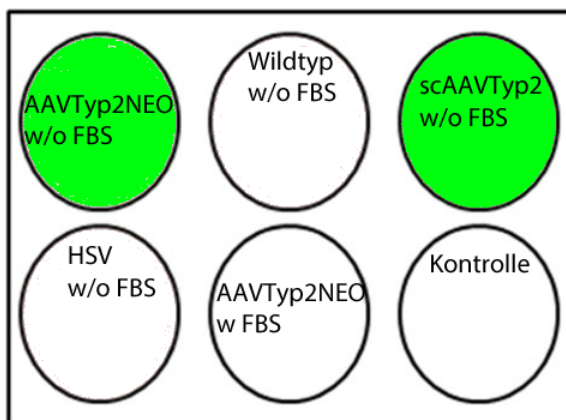


Abb. 12: Ovine MSC's Ovine Chondrozyten mit verschiedenen Varianten des AAV, Helferviren; Grün: Fluoreszenz positiv, Weiss: keine Fluoreszenz

4.2.2 Transduktion mit verschiedenen Explantaten

Bei der Transduktion der Explantate mit 6mm Höhe ohne Bohrloch konnten in einem Zeitraum von 2 Wochen keine GFP-markierten Zellen beobachtet werden.

4.2.3 Transduktion Explantate mit Bohrlöchern mit Knochenkleber

Es zeigten sich unter dem CLSM keine markierten Zellen, weder im Knochen noch im Knorpel.

4.2.4 Transduktion Explantate mit Bohrlöchern in Agarose

Auch hier waren keine GFP markierte Zellen sichtbar.

4.2.5 Transduktion Knorpelpellet

Hier wurde lediglich im Randbereich der Pellets und in der superfizialen Schicht einzelne fluoreszierende Zellen unter dem CLSM gesehen. Allerdings mit einem nur sehr schwachen Signal. Die Zellen der tieferen Schichten des Knorpels, sowie der Bereich der kalzifizierten Zone und subchondralen Knochen zeigten keine GFP Expression.

4.2.6 Virustransduktion Sagitalschnitte der Knorpelpellets

4.2.6.1 Lentiviraler Vektor FUGW

Am 1. und 3. Tag konnten keine markierten Zellen erkannt werden, am 5. Tag waren deutlich GFP markierte Zellen zu sehen, hauptsächlich im Bereich des subchondralen Knochens, der kalzifizierten Zone des Knorpels und in den tieferen Schichten des Knorpels.

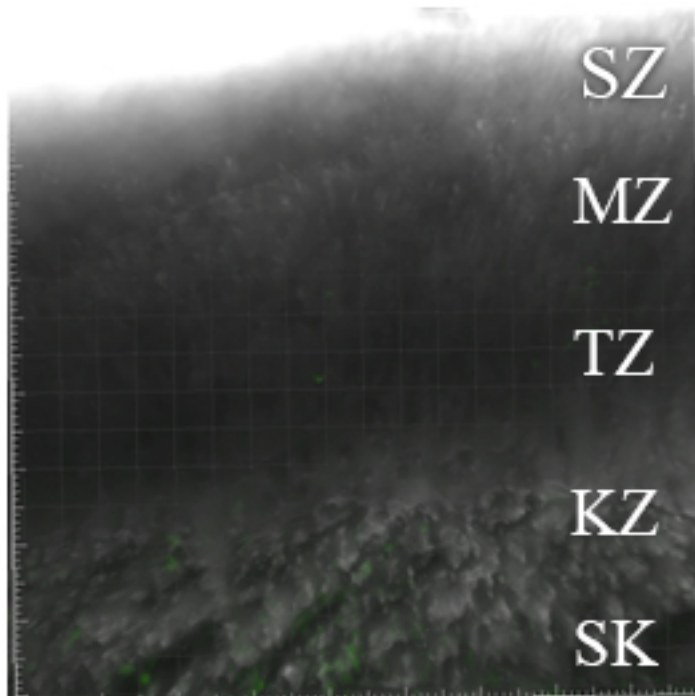


Abb. 13: CLSM Bilder Tag 1 post transductionem; nur einzelne schwach fluoreszierende Zellen im Bereich des subchondralen Knochens sichtbar; SZ: superfizielle Zone, MZ: mittlere Zone, TZ: tiefe Zone, KZ: kalzifizierte Zone, SK: subchondraler Knochen



Abb. 14: CLSM Bilder Tag 3 post transductionem; nur einzelne schwach fluoreszierende Zellen im Bereich des subchondralen Knochens sichtbar; SZ: superfizielle Zone, MZ: mittlere Zone, TZ: tiefe Zone, KZ: kalzifizierte Zone, SK: subchondraler Knochen

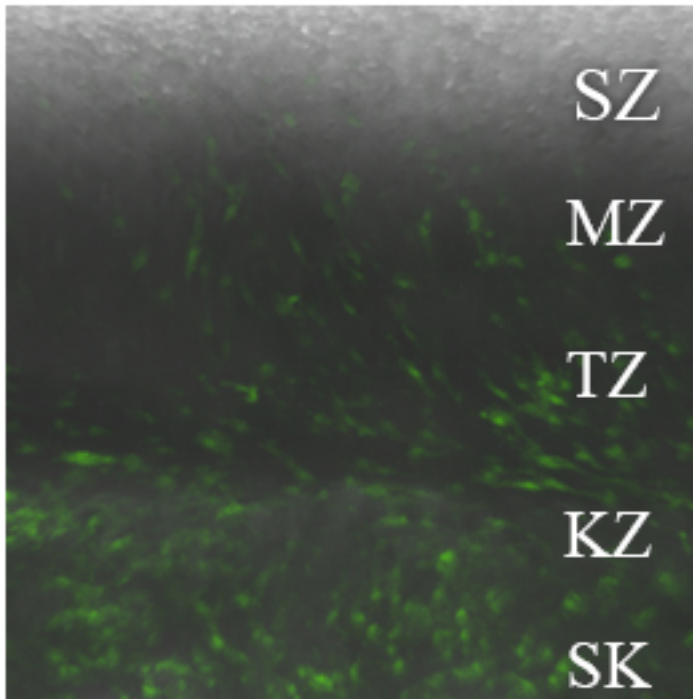


Abb. 15: CLSM Bilder Tag 5 post transductionem; Im subchondralen Knochen, der kalzifizierten Zone der tiefen Zone des Knorpels und der mittleren Zone deutlich fluoreszierende Zellen sichtbar; SZ: superfizielle Zone, MZ: mittlere Zone, TZ: tiefe Zone, KZ: kalzifizierte Zone, SK: subchondraler Knochen

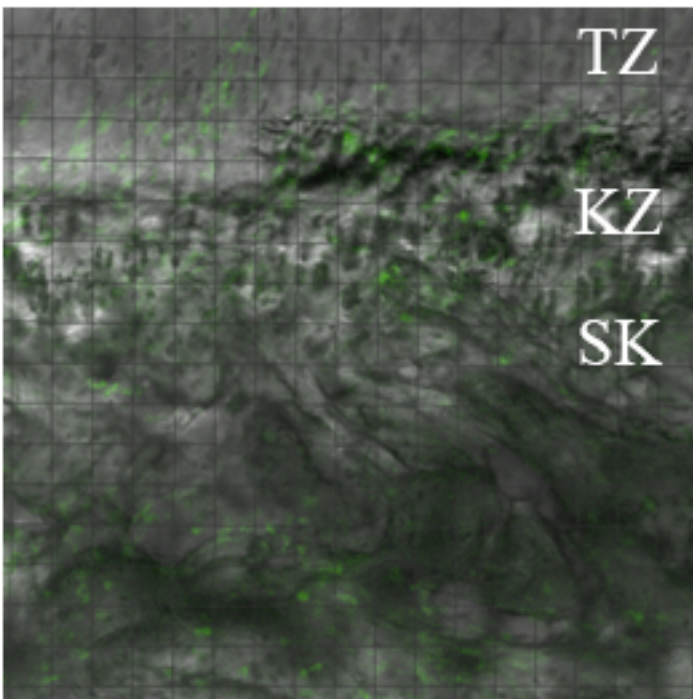


Abb. 16: CLSM Bilder Tag 5 post transductionem; Im subchondralen Knochen, der kalzifizierten Zone der tiefen Zone des Knorpels und der mittleren Zone deutlich fluoreszierende Zellen sichtbar; SZ: superfizielle Zone, MZ: mittlere Zone, TZ: tiefe Zone, KZ: kalzifizierte Zone, SK: subchondraler Knochen

4.2.6.2 *rAAV2GFP NEO*

Beim AAV waren am 2. Tag vereinzelte markierte Zellen zu sehen, welche sich gehäuft im subchondralen Knochen sowie in den tieferen Knorpelschichten zeigen. Vom 3. bis 5. Tag nahm die Anzahl der markierten Zellen zu.

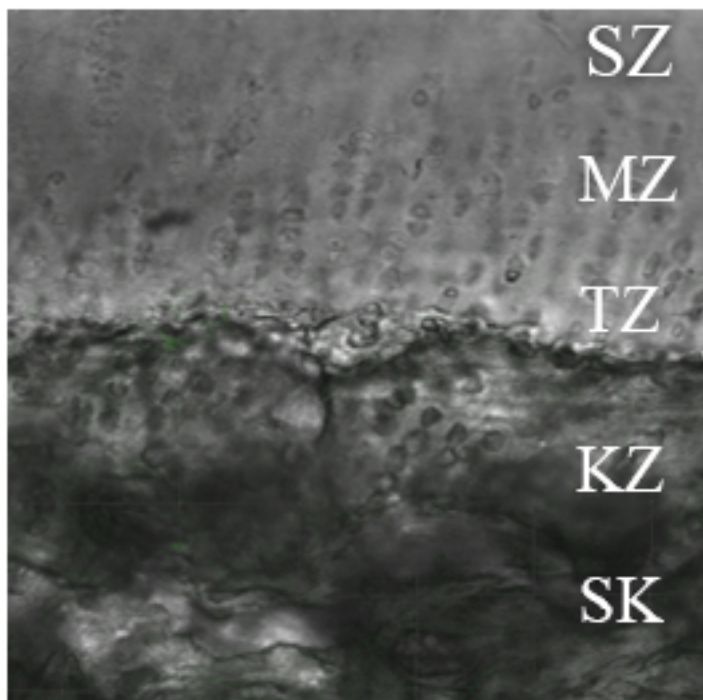


Abb. 17: CLSM Bilder Tag 2 post transductionem; Keine fluoreszierenden Zellen sichtbar; SZ: superfizielle Zone, MZ: mittlere Zone, TZ: tiefe Zone, KZ: kalzifizierte Zone, SK: subchondraler Knochen

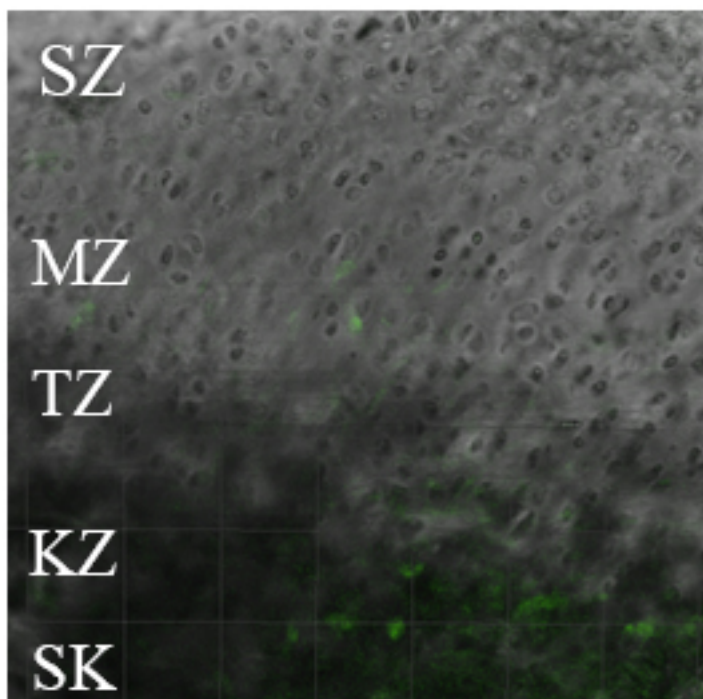


Abb. 18: CLSM Bilder Tag 3 post transductionem; Fluoreszierende Zellen im subchondralen Knochen und der kalzifizierten Zone sichtbar; SZ: superfizielle Zone, MZ: mittlere Zone, TZ: tiefe Zone, KZ: kalzifizierte Zone, SK: subchondraler Knochen

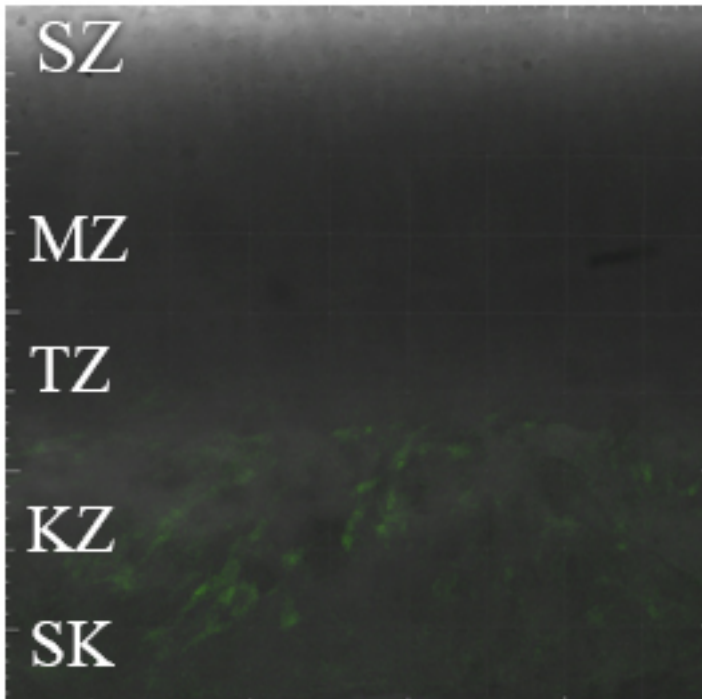


Abb. 19: CLSM Bilder Tag 5 post transductionem; Im subchondralen Knochen, der kalzifizierten Zone der tiefen Zone des Knorpels deutlich fluoreszierende Zellen sichtbar; SZ: superfizielle Zone, MZ: mittlere Zone, TZ: tiefe Zone, KZ: kalzifizierte Zone, SK: subchondraler Knochen

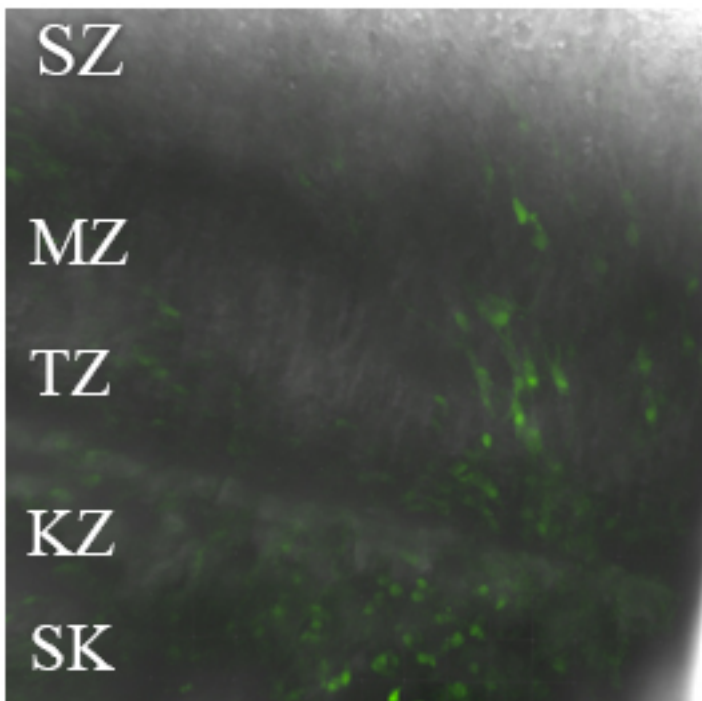


Abb. 20: CLSM Bilder Tag 5 post transductionem; Im subchondralen Knochen, der kalzifizierten Zone der tiefen Zone des Knorpels und der mittleren Zone deutlich fluoreszierende Zellen sichtbar; SZ: superfizielle Zone, MZ: mittlere Zone, TZ: tiefe Zone, KZ: kalzifizierte Zone, SK: subchondraler Knochen

4.2.6.3 Kontrollschnitte

An jedem Tag waren jeweils alle Kontrollen negativ, sprich es konnten keine GFP-positiven Zellen gefunden werden.

4.3 Toxizität Knochenkleber

Da noch keinerlei Erfahrung mit dem Knochenkleber Vetros Bone Putty, der Firma Biomedtrix, in einer Zellkultur existierten, wurde bei Explantaten probeweise Knochenkleber in die 3 Bohrlöcher für die Transduktion gespachtelt und jeweils mit Kontroll-Explantaten ohne Knochenkleber in wöchentlichem Abstand mittels Tod/Lebend-Färbung mikroskopisch kontrolliert. Im Vergleich zu den Kontroll-Explantaten zeigte sich keine schlechtere Vitalität.

4.4 Resultate Schnitte für die Tod/Lebend-Färbung

Zu Beginn des Experimentes wurden die Proben für die Tod/Lebendfärbung standardmässig mit der Exaktsäge in $300\mu\text{m}$ dicke Schnitte gesägt. Bei den finalen Versuchen wurden die bereits um die $300\mu\text{m}$ dicken Schnitte, welche von Hand geschnitten wurden verwendet. Im Vergleich zu den mit der Säge geschnittenen Proben zeigt sich bei den von Hand geschnittenen ein deutlicher Unterschied im Bereich des subchondralen Knochens und der kalzifizierten Zone des Knorpels. Wo bei den Schnitten mittels Exaktsäge nur sehr wenige Zellen zu sehen waren und die sich eher als autofluoreszente Fläche zeigte, befanden sich bei den von Proben welche von Hand geschnittenen wurden eine Vielzahl an einzelnen, gut differenzierbaren Zellen.

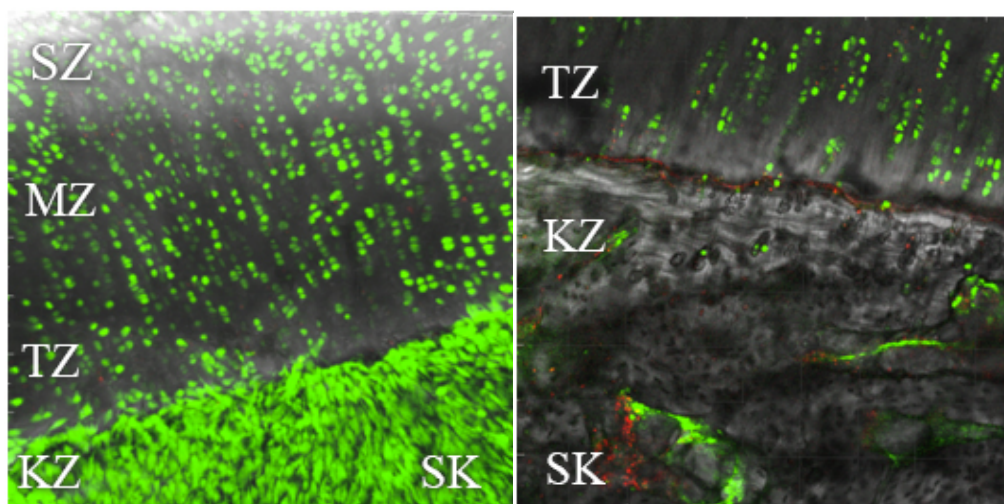


Abb. 21: Tod/Lebendfärbung: Darstellung vom subchondralen Knochen und kalzifizierten Schicht im Vergleich Schnitt mit Exaktsäge (li.) und von Hand (re). rechts deutlich einzelnen Zellen (grün) im Bereich zu erkennen im Vergl. Zu links; Aufnahme: CLSM; SZ: superfizielle Zone, MZ: mittlere Zone, TZ: tiefe Zone, KZ: kalzifizierte Zone, SK: subchondraler Knochen

4.5 Resultate MMA

Bei den GFP markierten Proben war lediglich ein sehr schwaches Signal im CLSM zu erkennen. Im Vergleich zu den mit 4% gepuffertem Formalin fixierten Proben noch schwächer.

4.6 Resultate Technovit 9100 Schnitte

Bei der Einbettung mit Technovit 9100 und späterer Betrachtung der Dünnschnitte leuchteten sowohl die negativ Kontrollen, als auch die vorher frisch fixierten positiven GFP Schnitte.

5 Diskussion

In dieser Arbeit gelang die Etablierung eines Modells, welches es ermöglicht Zellen im lebenden Knorpel und angrenzenden Knochen *in vitro* und dennoch im physiologischen Verband mittels viraler Vektoren farblich zu markieren um ihr natürliches Remodellierungsverhalten studieren zu können. Ein vergleichbar geeignetes Model zur Untersuchung von Knorpelremodellierung und Migrationsverhalten von Chondrozyten existierte bis dato noch nicht. Dieses Modell erlaubt die Untersuchung des vitalen Komplexes Knochen-Knorpel als Ganzes.

5.1 Methodik

Nach diversen Vorversuchen der Explantat-Entnahmetechnik erwies sich das OATS von Arthrex als schnellste und einfachste Methode ohne jegliche Effekte auf die Zellvitalität. Das Problem bei der Entnahme mit dem Luftdruckbohrer liegt vermutlich an der starken Hitzeentwicklung beim Bohren, welche nicht einmal durch ständiges Kühlen mit eiskalter isotonischer Kochsalzlösung verhindert werden konnte. Das Raushämmern der Proben mittels Flachmeisselosteotom zeigte eine ebenfalls hervorragende Vitalität, allerdings war auch hier der zylindrische Meissel des Arthrex-Systems überlegen, da bei letzterem die Entnahme durch Hämmern sehr viel einfacher war und eine standardisierte Form der Proben gewährleistet werden konnte, was beim Flachmeisselosteotom nicht der Fall war. Die folgenden Transduktionsversuche mittels viraler Vektoren der Explantate ergab fast ausschliesslich negative Ergebnisse. Dies kann zum einen daran liegen, dass die Viruskonzentrationen zu niedrig gewählt wurden oder sich mit dem Medium, in welchem die Explantate und Schnitte inkubierten, zu sehr verdünnt haben um effektiv zu transduzieren. Durchaus könnte es auch eine Rolle spielen, dass die Probengrösse zu Beginn zu gross gewählt wurde und somit die viralen Vektoren eventuell nicht durch den subchondralen Knochen diffundieren konnten, um die Zellen im kalzifizierten und darüber liegenden Knorpel ebenfalls zu erreichen. Beim lentiviralen Vektor wurde bereits beschrieben, dass die Transduktion trotz gleicher Konzentrationen und Volumina bei verschiedenen Tieren/Zellen sehr unterschiedlich ausfallen kann [55]. Die ersten GFP-markierten Zellen konnten erst im Knorpelpellet detektiert werden, nachdem der grösste Teil des spongiösen Knochens entfernt wurde. Hier wurden allerdings nur einzelne Zellen im Randbereich des Knorpels und in der Superfizialschicht transduziert. Erst die Längsschnitte der Pellets haben den gewünschten Erfolg der Transduktion der Zellen in allen Schichten ergeben. Die ersten

markierten Zellen sind ab dem 3. Tag post transductionem im CLSM sichtbar. Hier zeigte sich auch ein Unterschied zwischen dem lentiviralen und dem AAV-Vektor. Während bis zum 3. Tag beide Vektoren gleiche Transduktionsergebnisse zeigten, konnte man bei den Proben mit dem lentiviralen Vektor ab dem 5. Tag eine explosionsartige Steigerung der Transduktion erkennen, während der AAV-Vektor sich zum 5. Tag nur gering in seiner Transduktionsrate steigerte. In weiteren Versuchen sah man bei den lentiviralen Vektoren eine konstante Fluoreszenz der transduzierten Proben vom 5. bis zum 16. Tag, während der AAV bereits nach Tag 8 deutlich weniger fluoreszierende Zellen als am Tag 5 aufwies. Daher könnte der lentivirale Vektor sich als zuverlässiger erweisen vor allem bei Langzeitversuchen. Der lentivirale Vektor transduzierte im Knochen/Knorpel Schnitt deutlich mehr Zellen, als der AAV-Vektor, allerdings ist es für die weitere Verwendung des Modells zum Nachweis der Chondrozytenmotilität nicht notwendig, dass grundsätzlich alle Zellen fluoreszieren, es soll lediglich die Möglichkeit bestehen einzelne fluoreszierende Zellen über einen längeren Zeitraum verfolgen zu können. Und dies ist bei beiden Vektoren möglich, wenn auch hier der lentivirale Vektor einen Vorteil durch längere stabile Fluoreszenz aufweist.

Ein weiterer wichtiger Punkt in der Entwicklung des Modells ist das Zuschneiden der Proben. Zu Beginn wurden die Explantate mittels Exaktsäge in 300µm Sagittalschnitte gesägt, um diese dann mit der Tod/Lebend-Färbung zu beurteilen oder auch nach GFP markierten Zellen zu suchen. Der Bereich des subchondralen Knochens, sowie die kalzifizierte Zone zeigte sich als grüne autofluoreszierende Fläche ohne oder mit teilweise nur vereinzelt erkennbaren Zellen bei Schnitten, welche mit der Exaktsäge auf 300µm Dicke geschnitten wurden. Dieses Problem ist bereits von anderen Autoren beschrieben [66]. Im Vergleich dazu war bei den von Hand geschnittenen Proben eine Erkennung der einzelnen Zellen des Knochens und der kalzifizierten Zone möglich. Vermutlich wird bei den von der Exaktsäge geschnittenen Proben, die knöchernen Schichten durch kleine knöcherne Fragmente, bzw. entstandenes Knochenmehl verstopft und verhindert somit ein Betrachten der einzelnen Zellen in diesen Schichten. Ein Nachteil der handgeschnittenen Proben ist jedoch zum einen, dass es ein enormer Zeitaufwand im Vergleich zum Sägen bedeutet, zum anderen keine exakte standardisierte Grösse ermöglicht. Beim Schneiden der Längsschnitte wurde eine Dicke zwischen 250µm- 350µm erreicht, was im Bezug auf die mikroskopische Beurteilung eine relativ grosse Spannweite bedeutet. Je dicker die Proben sind desto schwerer ist es,

im CLSM eine geeignete Fokusebene zu finden und dementsprechend gute Bilder zu erhalten. Die Einbettungstechniken bringen ebenfalls Probleme mit sich. So gut man die GFP-markierten Zellen im CLSM an frisch mit 4% Formalin fixierten oder noch lebenden Proben erkennt, stellt es eine grosse Herausforderung dar, diese Proben mit GFP-markierten Zellen dauerhaft einzubetten und Dünnschnitte anzufertigen ohne die Leuchtkraft der markierten Zellen einzubüssen. Zum einen gibt es die Möglichkeit Paraffinschnitte herzustellen, diese müssen aber je nach Knochenhärte erst einmal mit EDTA entkalkt werden. Weil das Schaf einen der härtesten Knochen besitzt, dauert dieser Vorgang selbst bei kleinsten Proben mehrere Monate. Zudem ist es nicht klar, ob und wie EDTA das GFP beeinflussen kann. Die andere Methode ist das Einbetten in MMA, ein Kunststoff welcher das Entkalken der Proben nicht nötig macht. Es wurde versucht, transduzierte Proben mittels MMA einzubetten. Allerdings war das Ergebnis nicht sehr vielversprechend. Die Zellen zeigten zwar noch eine Fluoreszenz, aber in einem so geringen Masse, dass es schwer war, sie von nicht-transduzierten Zellen zu unterscheiden. Ein Problem könnte die Erhitzung der Proben bei der Auspolymerisation von über 65° Celsius darstellen, welche das GFP höchstwahrscheinlich denaturiert. MMA ist allerdings nicht für die Immunhistochemie geeignet, daher wurde das Technovit 9100 getestet, welches laut Herstellerangaben und Literatur Immunhistochemie der Schnitte möglich machen soll und zudem ohne eine hohe Auspolymerisationstemperatur zurecht kommt indem die Polymerisation im Gefrier-oder Kühlschrank bei -20 – 4° Celsius vonstatten geht [58]. Bei dieser Methode war allerdings das Problem, dass wieder eine starke grüne Autofluoreszenz zu sehen war, und somit wieder nicht eindeutig GFP und nicht-GFP markierte Proben unterschieden werden konnten. Schafsknochen bringt auch generell immer wieder Probleme bei der Dünnschnitt-Herstellung mit sich. Aufgrund der extrem harten Knochensubstanz sind Knochenproben von Schafen generell sehr schwierig im Vergleich zu Proben anderer Spezies zu schneiden und ohne Verlust von Probenanteilen auf den Objektträger zu ziehen.

5.2 Schlussfolgerung und Perspektiven

Mit diesem Modell ist es möglich die Zellen im physiologischen Verbund *in vitro* zu kultivieren und sie ohne Vitalitätseinschränkung zur weiteren Untersuchung zu visualisieren. Denn so ist es möglich, die vitalen Längsschnitte der osteochondralen Explantate ohne weitere Manipulation und Zurechtschneiden im CLSM zu untersuchen und danach wieder zurück in die Zellkultur zu setzten. Ein Abbruch des Versuches ist nicht nötig. Da das GFP-exprimierende Gen keinen negativen Effekt auf die vitalen Zellen hat und im Genom stabil integriert ist, geht die Markierung auch nicht verloren. Zudem ist es von Vorteil, dass die viralen Vektoren nur eine bestimmte Zeit lang eine Transduktionskapazität aufweisen und nach einer gewissen Zeit ein Maximum erreicht ist. Zusätzlich wird dies auch durch das Absaugen der Virussuspension und spülen der Schnitte nach einer definierten Zeit sichergestellt. Auch werden hier nur replikationsdefiziente Vektoren verwendet, sprich eine unkontrollierte Transduktion weiterer Zellen durch das Vermehren der viralen Vektoren über einen längeren Zeitraum kann ausgeschlossen werden, was Missverständnisse in späteren Versuchen verhindert. Vorteil ist es zudem, dass nun ein und derselbe markierte vitale Frischzellschnitt über längere Zeit mikroskopiert werden kann. Dies kann ein Verfolgen und somit das Nachweisen von migrierenden Zellen im Bereich Knochen-Knorpel beispielsweise mittels Zeitraffer Aufnahmen ermöglichen. Ein Grund für die wenig vorhandene Literatur zum Thema Knorpelremodellierung oder auch zu den Zellen in der kalzifizierten Zone ist meines Erachtens eine Folge davon, dass es keine geeignete Methodik gibt oder gab, welche es ermöglichte diesen Vorgang überhaupt zu betrachten.

Ein weiteres Fehldenken ist es ebenfalls Knorpel und Knochen generell in der Forschung auseinander zu halten, zumal sich diese aus dem gleichen Mesoderm entwickeln [5]. Es gibt zahlreiche Studien welche den subchondralen Knochen oder den Knorpel untersuchen und synthetisierte Proteine oder Signale nachweisen, aber wenige, welche wirklich den Zusammenhang als komplexe Einheit betrachten. Im Bezug auf Osteoarthritis und andere degenerative Gelenksveränderungen wurde bereits gezeigt, dass der Knorpel vom subchondralen Knochen abhängig ist [63]. Jedoch gibt es in der Literatur kaum den Gedanken, dass der natürliche Regenerationsvorgang überhaupt existieren könnte, geschweige denn wirklich existiert. Gleichgültig, was man in der Literatur zum Thema Knorpel liest, der erste Satz verweist stets darauf, dass Knorpel unheilbar und unfähig zur Regeneration ist, ohne dass dies in Frage gestellt wird.

Nichtsdestotrotz wird intensiv an neuen Zelltherapien, künstlichen Knorpelgerüsten kombiniert mit verschiedenen Arten von Stamm- und Vorläuferzellen geforscht. Die Fülle und Anzahl neuer Versuche und Methoden einer Knorpelheilung wirft die Frage auf, ob es nicht eine grosse Wissenslücke in der allgemeinen Grundlagenforschung zum Thema Knorpel gibt. Denn ist das Grundprinzip des Verhaltens bei gesundem Knorpel unbekannt, wird es kaum gelingen können eine geeignete Therapiemethode zu entwickeln, was unter anderem zu sehen ist an den unendlich vielen Methoden, welche bis jetzt in der Langzeitbetrachtung alle wenig erfolgversprechend sind.

Generell ist das entwickelte Modell das erste, welches es tatsächlich ermöglichen sollte das Migrationsverhalten der Chondrozyten nachweisen zu können und somit die Hypothese zu untersuchen, ob es tatsächlich eine Knorpelremodellierung gibt ähnlich anderen Organen des Körpers, beispielsweise der Haut oder dem Darm. Es ist ebenso auch ein Modell, um den engen Zusammenhang zwischen subchondrale Knochen und Knorpel eindeutig zu beweisen und dies nicht nur durch Expression der gleichen Signale oder Moleküle sondern schlicht durch die Zellbewegungen innerhalb und durch die verschiedenen Zonen. Auch ist es möglich, die *in vitro* Bedingungen so zu modifizieren, dass man das Verhalten nicht nur unter physiologischen sondern ebenso unter pathologischen Umständen untersuchen könnte durch einfache Zugabe von entsprechenden Stimulantien, welche im geschädigten Knorpel oder in der Synovia eines erkrankten Gelenkes zu finden sind. Sollte dies der Fall sein und könnte sich dies bestätigen, würde man komplett neue Therapieansätze für Knorpelschäden entwickeln können. Denn wäre der Knorpel tatsächlich fähig zur Regeneration durch die Fähigkeit sich zu remodellieren wie andere Organe auch, dann müsste man „nur“ eine Lösung finden um die Regeneration zu beschleunigen und die Degeneration so weit wie möglich zurückdrängen. Und das wäre nach Jahrzehnte langem Stillstand in der Knorpelforschung eine Revolution.

6 Literaturverzeichnis

1. Buckwalter, J.A. and H.J. Mankin, Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum*, 1998. 41(8): p. 1331-42.
2. Buckwalter, J.A., Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther*, 1998. 28(4): p. 192-202.
3. Secretan, C., K.M. Bagnall, and N.M. Jomha, Effects of introducing cultured human chondrocytes into a human articular cartilage explant model. *Cell Tissue Res*, 2010. 339(2): p. 421-7.
4. Madry, H., C.N. van Dijk, and M. Mueller-Gerbl, The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2010. 18(4): p. 419-33.
5. Archer, C.W. and P. Francis-West, The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003. 35(4): p. 401-4.
6. Poole, A.R., et al., Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 2002. 61 Suppl 2: p. ii78-81.
7. Martin, J.A. and J.A. Buckwalter, The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am*, 2003. 85-A Suppl 2: p. 106-10.
8. Moger, C.J., et al., Regional variations of collagen orientation in normal and diseased articular cartilage and subchondral bone determined using small angle X-ray scattering (SAXS). *Osteoarthritis Cartilage*, 2007. 15(6): p. 682-7.
9. Oegema, T.R., Jr., et al., The interaction of the zone of calcified cartilage and subchondral bone in osteoarthritis. *Microsc Res Tech*, 1997. 37(4): p. 324-32.
10. Broom, N.D. and C.A. Poole, A functional-morphological study of the tidemark region of articular cartilage maintained in a non-viable physiological condition. *J Anat*, 1982. 135(Pt 1): p. 65-82.
11. Mwale, F., et al., Selective assembly and remodelling of collagens II and IX associated with expression of the chondrocyte hypertrophic phenotype. *Dev Dyn*, 2000. 218(4): p. 648-62.
12. Franzen, A., et al., Proteoglycans and calcification of cartilage in the femoral head epiphysis of the immature rat. *J Bone Joint Surg Am*, 1982. 64(4): p. 558-66.
13. Roach, H.I., T. Aigner, and J.B. Kouri, Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis*, 2004. 9(3): p. 265-77.
14. Clark, J.M. and J.D. Huber, The structure of the human subchondral plate. *J Bone Joint Surg Br*, 1990. 72(5): p. 866-73.
15. Peretti, G.M., et. al., Pathophysiology of Cartilage Injuries, in *Orthopaedic Sports Medicine*, R.R. Fabrizio Margheritini, Editor. 2011, Springer-Verlag, Italia. p. 49-58.
16. Mankin, H.J., The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am*, 1982. 64(3): p. 460-6.
17. Shapiro, F., S. Koide, and M.J. Glimcher, Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, 1993. 75(4): p. 532-53.
18. Schindler, O.S., Current concepts of articular cartilage repair. *Acta Orthop Belg*, 2011. 77(6): p. 709-26.

19. Peretti, G.M., et al., Current surgical options for articular cartilage repair. *Acta Neurochir Suppl*, 2011. 108: p. 213-9.
20. Hunziker, E.B., Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. 10(6): p. 432-63.
21. Hunziker, E.B., et al., An educational review of cartilage repair: precepts & practice--myths & misconceptions--progress & prospects. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015. 23(3): p. 334-50.
22. van Osch, G.J., et al., Cartilage repair: past and future--lessons for regenerative medicine. *J Cell Mol Med*, 2009. 13(5): p. 792-810.
23. Lim, H.C., et al., Current treatments of isolated articular cartilage lesions of the knee achieve similar outcomes. *Clin Orthop Relat Res*, 2012. 470(8): p. 2261-7.
24. Davies, L.C., et al., Chondroitin sulphate impedes the migration of a sub-population of articular cartilage chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008. 16(8): p. 855-64.
25. Lyman, J.R., et al., Response of Chondrocytes to Local Mechanical Injury in an Ex Vivo Model. *Cartilage*, 2012. 3(1): p. 58-69.
26. Bos, P.K., et al., Cellular origin of neocartilage formed at wound edges of articular cartilage in a tissue culture experiment. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008. 16(2): p. 204-11.
27. Koelling, S., et al., Migratory chondrogenic progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis. *Cell Stem Cell*, 2009. 4(4): p. 324-35.
28. Candela, M.E., et al., Resident mesenchymal progenitors of articular cartilage. *Matrix Biol*, 2014. 39: p. 44-9.
29. Williams, R., et al., Identification and clonal characterisation of a progenitor cell sub-population in normal human articular cartilage. *PLoS One*, 2010. 5(10): p. e13246.
30. Morales, T.I., Chondrocyte moves: clever strategies? *Osteoarthritis Cartilage*, 2007. 15(8): p. 861-71.
31. Bardos, T., et al., Pilot Study of Cartilage Repair in the Knee Joint with Multiply Incised Chondral Allograft. *Cartilage*, 2015. 6(2): p. 73-81.
32. Giepmans, B.N., et al., The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science*, 2006. 312(5771): p. 217-24.
33. Chalfie, M., et al., Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994. 263(5148): p. 802-5.
34. Daya, S. and K.I. Berns, Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev*, 2008. 21(4): p. 583-93.
35. Vigna, E. and L. Naldini, Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med*, 2000. 2(5): p. 308-16.
36. Bantel-Schaal, U. and H. zur Hausen, Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site. *Virology*, 1984. 134(1): p. 52-63.
37. Srivastava, A., E.W. Lusby, and K.I. Berns, Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol*, 1983. 45(2): p. 555-64.

38. Berns, K.I. and R.M. Linden, The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays*, 1995. 17(3): p. 237-45.
39. Schnepf, B.C., et al., Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J Virol*, 2005. 79(23): p. 14793-803.
40. Xiao, X., J. Li, and R.J. Samulski, Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol*, 1996. 70(11): p. 8098-108.
41. Chirmule, N., et al., Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther*, 1999. 6(9): p. 1574-83.
42. McCarty, D.M., et al., Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther*, 2003. 10(26): p. 2112-8.
43. McCarty, D.M., Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther*, 2008. 16(10): p. 1648-56.
44. Wang, Z., et al., Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther*, 2003. 10(26): p. 2105-11.
45. Wu, J., et al., Self-complementary recombinant adeno-associated viral vectors: packaging capacity and the role of rep proteins in vector purity. *Hum Gene Ther*, 2007. 18(2): p. 171-82.
46. Warnock, J.N., C. Daigre, and M. Al-Rubeai, Introduction to viral vectors. *Methods Mol Biol*, 2011. 737: p. 1-25.
47. Matrai, J., M.K. Chuah, and T. VandenDriessche, Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Mol Ther*, 2010. 18(3): p. 477-90.
48. Naldini, L., et al., In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 1996. 272(5259): p. 263-7.
49. de Andrade Pereira, B., et al., Transcriptional targeting of DCs with lentiviral vectors induces antigen-specific tolerance in a mouse model of multiple sclerosis. *Gene Ther*, 2013. 20(5): p. 556-66.
50. Yu, J., et al., GFP Labeling and Hepatic Differentiation Potential of Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Physiol Biochem*, 2015. 35(6): p. 2299-308.
51. Chen, H., et al., Expression of human factor IX gene in murine plasma through lentiviral vector-infected haematopoietic stem cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006. 33(12): p. 1196-201.
52. Nienhuis, A.W., C.E. Dunbar, and B.P. Sorrentino, Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells. *Mol Ther*, 2006. 13(6): p. 1031-49.
53. Sauer, A.V., et al., Progress in gene therapy for primary immunodeficiencies using lentiviral vectors. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2014. 14(6): p. 527-34.
54. Palfi, S., et al., Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet*, 2014. 383(9923): p. 1138-46.
55. Lois, C., et al., Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*, 2002. 295(5556): p. 868-72.
56. Jiang, X., et al., Histological analysis of GFP expression in murine bone. *J Histochem Cytochem*, 2005. 53(5): p. 593-602.

57. Xiong, H., et al., Chemical reactivation of quenched fluorescent protein molecules enables resin-embedded fluorescence microimaging. *Nat Commun*, 2014. 5: p. 3992.
58. Kulzer, H., Technovit Histotechnik-Polymerisationsysteme. 2011, Heraeus Kulzer p. 10-13.
59. Yang, R., et al., Immunohistochemistry of matrix markers in Technovit 9100 New-embedded undecalcified bone sections. *Eur Cell Mater*, 2003. 6: p. 57-71; discussion 71.
60. Tsien, R.Y., The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 1998. 67: p. 509-44.
61. de Vries-van Melle, M.L., et al., An osteochondral culture model to study mechanisms involved in articular cartilage repair. *Tissue Eng Part C Methods*, 2012. 18(1): p. 45-53.
62. Gantenbein, B., et al., An in vitro organ culturing system for intervertebral disc explants with vertebral endplates: a feasibility study with ovine caudal discs. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2006. 31(23): p. 2665-73.
63. de Vries-van Melle, M.L., et al., Chondrogenesis of mesenchymal stem cells in an osteochondral environment is mediated by the subchondral bone. *Tissue Eng Part A*, 2014. 20(1-2): p. 23-33.
64. Bush, P.G. and A.C. Hall, The volume and morphology of chondrocytes within non-degenerate and degenerate human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003. 11(4): p. 242-51.
65. Gantenbein-Ritter, B., et al., Confocal imaging protocols for live/dead staining in three-dimensional carriers. *Methods Mol Biol*, 2011. 740: p. 127-40.
66. Stoddart, M.J., et al., A comparison of non-radioactive methods for assessing viability in ex vivo cultured cancellous bone: technical note. *Eur Cell Mater*, 2006. 12: p. 16-25; discussion 16-25.

7 Abkürzungen

2-ME	2-Mercaptoethanol
AA	Acrylamid
AAVTyp2NEO	Adeno-associated Virus Typ 2 Neomycin
ADL	Adrenoleukodystropie
AIDS	Aquired Immundeficiency syndrome
APS	Ammonium Persulfat
Bis	Bisacrylamid
BSA	Bovines Serum Albumin
CLSM	Confokale laserscanning mikroskop
CPZ	Chondroprogenitorzellen
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fetal bovine serum
FUGW	Flip, ubiquitin promoter, GFP and WRE vector
Gcp	Genome containing particles
GFP	Green fluorescence Protein
HBSS	Hanks balanced saline solution
HCL	Salzsäure
HIV	Human immunodeficiency Virus
HyDs	Hybrid Detectors
kDA	Kilo Dalton
KZ	Kalzifizierte Zone
LTR	Long terminal repeat
M	Molar
MMA	Methylmetacrylat
MOI	Multiplicity of infection
M _R	Molekülmasse in kDa
MSC	Mesenchymalen Stammzellen

MZ	Mittlere Zone
NaCl	Natriumchlorid
OA	Osteoarthritis
OATS	Osteochondral Auto/Allograft System
PAA	Polyacrylamid (eng.: SDS)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PMMA	Polymethylmetacrylat
PMT	Photomultiplier
RNA	Ribo nuclein acid
Rpm	Rounds per minute
scAAV2GFP	Selbstkomplementäres Adeno-assoziiertes Virus Typ 2 GFP
SDS (englisch)	Sodium Dodecyl Sulfat (deutsch: PAA)
SIN	Selbst-inaktivierend
SK	Subchondraler Knochen
ssAAV	<i>Singel strand/</i> einzelsträngiges AAV
SZ	Superfizielle Zone
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TZ	Tiefe Zone
WRE	Woodchuck hepatitis virus regulatory element

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt **Prof. Brigitte von Rechenberg**. Zum einen für das spannende Thema meiner Dissertation, sowie die hervorragende Betreuung, nicht nur fachlich sondern auch menschlich. Dank auch dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatte und auch wenn die Zeit noch so knapp war bei allen Problemen immer Zeit gefunden hatte mir weiterzuhelfen.

Ein herzlicher Dank an **Prof. Cornel Fraefel** zum einen für die Übernahme der 2. Korrektur, sowie für die absolut reibungslose, unkomplizierte und fantastische Zusammenarbeit mit ihm und seiner Gruppe. Danke für die ständige Unterstützung, Beratung, und Verwirklichung dieser Arbeit. Auch für das stets offene Ohr und die nette und liebenswerte Art.

Vielen lieben und herzlichen Dank an meine liebste und beste Betreuerin **Ladina Ettinger Ferguson**. Ohne sie wäre die Doktorarbeit wohl nie zu einem erfolgreichen Ende gekommen. Danke für das geballte Fachwissen, die Tipps und Tricks vom Profi, die unendlich schönen und lustigen Unterhaltungen, die vielen endlosen Krisensitzungen, die Kaffeepausen und nicht zu vergessen die schönen Ausflüge nach Davos! Danke!

Ebenso ein herzliches Danke an **Aymone Lenisa**, Herrscherin über das Labor und alle Gerätschaften! Danke für die ständige Hilfe, das stets offene Ohr und das überragende Krisenmanagement für die vielen endlosen Probleme des Laboralltags!

Danke an **Francesca Franzoso** für die AAV-Vektoren, für die wunderschönen humorvollen Momente im Labor und für die hingebungsvolle Unterstützung bei allen meinen, nicht gerade wenigen, fachlichen Problemen. Ebenso an **Bruna de Andrade Pereira** für die unkomplizierte Art, Hilfe und Unterstützung meines Projektes.

Danke an **Theres Meili Prodan** für die höchst unterhaltsamen und fachlich kompetente Hilfe beim Western Blotten.

Ein ganz dickes Lob und Dankeschön an **Paul Müller**. Da ich aufgrund meiner Studie sehr viel Zeit bei ihm verbracht habe, möchte ich mich noch einmal ganz herzlich bedanken. Für seine höchst professionelle Arbeit und sein absolut respektvollen Umgang mit unseren Schafen.

Danke an **Urs Möri** der „Steri-Gott“! Für die Engelsgeduld mit mir und all meinen ominösen Gerätschaften.

Danke **Wülerich aka. Huldrych, Andreas Gloger** Diplom Biologe und PhD Student der ETH, bester Freund seit der Schulzeit, welcher mich in jeglicher Hinsicht schon seit wir uns kennen immer zu 100% unterstützt hat. Danke für die wunderschöne Zeit und vor allem auch für die Hilfe bei der Laborarbeit und allen fachbezogenen Fragen!

Danke an **Lorenz Schweinsberg**, dafür dass er schon immer an mich glaubt und mir auch trotz der weiten Distanz immer zur Seite stand. Danke für die wunderschönen Jahre die wir uns kennen.

Danke an **Karina Klein** für die Zusammenarbeit (Chaosteam) und die unzähligen belustigenden netten Abende!

Danke auch an das Multitalent **Salim Darwiche** für die Hilfe und Unterstützung und nicht zu vergessen die sensationellen kulinarischen Köstlichkeiten.

Danke **Flurina Clement Frey** für die tatkräftige Unterstützung und Betreuung zur Vollendung meines Projektes.

Danke an das **gesamte MSRU Team** für die wunderschöne Zeit in Zürich!

Danke **Maren Stempel Estelmann** für die beste Tischnachbarin. Danke **Anika Drechsler** für alles und die wunderschöne Zeit. Danke **Ramon Bucher** für die herrlich lustigen Gespräche. Danke **Mario Benn** für die Etablierung von unschlagbar gutem Chaostennis und vor allem auch für die Unterstützung und ständige Hilfe bei meiner Dissertation und nicht zu vergessen die netten Geschichten und überragenden Exel- und Wordkenntnisse. Danke **Jola Plihal** für den „Pepp“, welchen du in die Gruppe gebracht

hast. Danke an die zumeist nachtaktive **Nadja Wolfer** meine treueste, verträumteste Nachtsch- und Hive-Kompanin. Danke **Philipp Kindt** für die super Zeit und die Unterstützung in allen Lebenslagen. Danke meine liebste **Serah Saitowitz** für einfach alles und unsere unschlagbare Freundschaft! Danke liebste **Dagmar Verdino** für die reibungslosen OP's und die super schöne Zeit mit dir! Danke an **Florian Hipp** für die kurze aber absolut geniale Zeit zusammen in Zürich! Danke **Michael Künzler** für die gute Unterhaltung, der ständige Kampf um Käthi's Auto oder die Laborgeräte und die vielen schönen Abende!

Danke an meinen ersten und unangefochtenen besten Chef den man sich wünschen kann meiner ersten Assistenzstelle in Niederbayern **Dr. Stephan Meyer-Eilers** und **Matilde Kalis**, welche mich tatkräftig in meinem Vorhaben zur Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Danke **Jule Steiner** für deine Bilderformatierungs-Hilfe!

Und zu guter Letzt Danke ich den wichtigsten Menschen in meinem Leben, meiner **Familie**. Danke für eure Liebe und Unterstützung in jeglicher Hinsicht! Ohne euch wäre dies alles nie möglich gewesen!

Curriculum Vitae

Vorname Name	Sophie Schöberl
Geburtsdatum	05.05.1986
Geburtsort	Stuttgart, Deutschland
Nationalität	deutsch
09/1996– 07/2006	Ev. Heidehofgymnasium, Stuttgart, Deutschland
07/2006	Allgemeine Hochschulreife, ev. Heidehofgymnasium, Stuttgart, Deutschland
09/2007 – 03/2010	Studium der Veterinärmedizin, Szent István Universität, Budapest, Ungarn
04/2010 – 03/2013	Studium Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin, Berlin, Deutschland
03/2013	Erhalt der Approbation, Freie Universität Berlin, Berlin, Deutschland
02/2014 – 09/2015	Anfertigung der Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS am Departement für Pferde, Abteilung MSRU der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich Direktor: Prof. Dr. med. vet. Anton Fürst, Dipl. ECVS
04/2013 – 01/2014	Assistenzärztin bei Pferdepraxis Dr. Stephan Meyer- Eilers, Laberweinting, Deutschland
